



Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Instituto Superior de Agronomia - Faculdade de Medicina
Veterinária

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ENZIMÁTICA, EM UMA DIETA À BASE DE CEVADA
PARA FRANGOS DE CARNE, EM DIFERENTES PERÍODOS DO SEU
CRESCIMENTO

VÂNIA ALEXANDRA DA SILVA CARDOSO

CONSTITUIÇÃO DO JURI

PRESIDENTE

Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha

VOGAIS

Doutor Luís Manuel dos Anjos Ferreira

Doutor Carlos Mendes Andrade Godinho Fontes

Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel dos
Anjos Ferreira

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Madalena
dos Santos Lordelo

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Instituto Superior de Agronomia - Faculdade de Medicina
Veterinária

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ENZIMÁTICA, EM UMA DIETA À BASE DE CEVADA
PARA FRANGOS DE CARNE, EM DIFERENTES PERÍODOS DO SEU
CRESCIMENTO

VÂNIA ALEXANDRA DA SILVA CARDOSO

MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA/PRODUÇÃO ANIMAL

CONSTITUIÇÃO DO JURI

PRESIDENTE

Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha

VOGAIS

Doutor Luís Manuel dos Anjos Ferreira

Doutor Carlos Mendes Andrade Godinho Fontes

Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel dos
Anjos Ferreira

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Madalena
dos Santos Lordelo

2013

LISBOA

Agradecimentos

Começo por agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Luís Ferreira e à minha co-orientadora, Professora Doutora Madalena Lordelo, a disponibilidade e a paciência demonstradas ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Fontes, que me acompanhou na elaboração deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

Agradeço também à Doutora Teresa Ribeiro, que desde o início sempre se mostrou disponível para me orientar e ajudar em todas as dificuldades que foram surgindo no decorrer deste trabalho, com muita paciência, boa disposição e sabedoria.

A toda a equipa do Laboratório de Nutrição da Faculdade de Medicina Veterinária, o meu bem-haja.

Estou também agradecida à equipa do Departamento de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia.

Por fim, um agradecimento especial aos meus pais, pois sem eles não teria conseguido chegar onde cheguei. E ao meu namorado que sempre demonstrou muita paciência.

Resumo

Neste trabalho, analisou-se a possibilidade de restringir a suplementação enzimática de uma dieta à base de cevada, a apenas alguns períodos de crescimento de frangos de carne. Foi utilizado um preparado multi-enzimático comercial (Rovabio®) com atividade sobre os componentes celulósicos e hemicelulósicos da parede celular. Os animais foram divididos por 4 tratamentos, ao 1º dia de idade. Os 4 tratamentos consistiram na alimentação das aves com dietas a) não suplementadas (CN) ou suplementadas com enzimas exógenas b) durante todo o período experimental (CP35), c) durante os primeiros 23 dias (CP23) ou d) os primeiros 11 dias do ensaio (CP11). Os dados revelaram que o desempenho produtivo, atividade enzimática gastrointestinal e tamanhos relativos dos órgãos abdominais, dos frangos alimentados com dietas suplementadas durante os 35 dias, foram idênticos ($P < 0.05$) aos dos frangos alimentados com dietas suplementadas durante os 11 dias iniciais. Os desempenhos produtivos foram significativamente diferentes entre animais alimentados com dietas suplementadas e dietas não suplementadas. Adicionalmente, não foram encontradas diferenças significativas entre os três tratamentos suplementados (CP11, CP23 e CP35). Estes resultados sugerem que a ação de enzimas exógenas, usadas para suplementar dietas à base de cevada para frangos se restringe ao primeiro período do ciclo produtivo dos frangos.

Palavras-Chave: Frangos, Cevada, Polissacáridos Não Amiláceos, β -glucanos, Suplementação enzimática

Abstract

In this experiment, we have analyzed the possibility of restricting enzyme supplementation of barley-based diets, to exclusively some periods of broiler's life. A commercial enzyme mixture (Rovabio®) with activity against plant cell wall cellulosic and hemicellulosic compounds was selected. At 1-day-old the chicks were divided into 4 treatments. The treatments consisted of birds fed on a a) non supplemented diet or birds fed diets supplemented with the exogenous enzyme for the b) entire period of the experiment (CP-35), c) the first 23 days (CP23) and d) the first 11 days of the trial (CP11). The data revealed that broilers fed diets supplemented with enzymes throughout their entire life had identical ($P < 0.05$) growth performance, gastrointestinal enzyme activity and relative organ sizes to broilers fed supplemented diets in the first 11 days. The growth performance had statistically different from the broilers fed supplemented feeds and non-supplemented feeds. Additionally there were no differences between the three different supplemented treatments (CP11, CP23 and CP35). These results suggest that the action of exogenous enzymes, when used to supplement barley-based diets for broilers, is restricted to the earliest periods of the broiler's production cycle.

Key-words: Poultry, Barley, Non-Starch Polysaccharides, β -glucans, enzyme supplementation

Índice

Declaração	ii
Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	vi
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii
Lista de símbolos	xv
Capítulo I - Introdução	1
Capítulo II – Revisão Bibliográfica	2
1. Caracterização do sector avícola	2
1.1. Breve caracterização económica da avicultura em Portugal e no Mundo	2
1.2. O Frango de carne	5
1.2.1. Sistemas de produção.....	5
1.2.2. Raças e estirpes	6
1.2.3. Alimentação e manejo.....	7
1.2.4. Fisiologia digestiva e digestão.....	8
2. Parede Celular Vegetal	11
2.1. Estrutura da parede celular	11
2.2. Composição da parede celular vegetal	12
2.2.1. Celulose	12
2.2.2. Hemicelulose	13
2.2.2.1. Xilanos	14
2.2.2.2. β-glucanos	15
2.2.2.3. Xiloglucanos.....	16
2.2.2.4. Outros compostos hemicelulósicos	16
2.2.3. Pectinas	17
2.2.4. Outros componentes das paredes celulares	17

2.3.	Modelos das paredes celulares vegetais	18
2.1.	Efeitos dos polissacáridos não amiláceos (PNA) na alimentação de frangos de carne	19
3.	Cereais	21
3.1.	A cevada na alimentação de aves	22
3.1.1.	Consumo e produção de cevada em Portugal e na Europa	23
3.1.2.	Estrutura do grão de cevada.....	23
3.1.3.	Composição nutricional.....	24
3.1.1.	Efeito dos PNA da cevada na alimentação de frangos	25
4.	Suplementação enzimática.....	26
4.1.	Enquadramento histórico e função	26
4.2.	Utilização de enzimas na alimentação animal.....	26
4.2.1.	Celulases e Hemicelulases.....	27
4.2.2.	Efeito das enzimas na alimentação animal	28
4.2.2.1.	Efeito da variabilidade dos lotes de cevadas na suplementação enzimática.....	28
4.2.2.2.	Efeito da suplementação diferencial ao longo do tempo	29
5.	Objetivo	30
Capítulo III – Material e Métodos		31
1.	Procedimentos Laboratoriais	31
1.1.	Análise da cevada	31
1.2.	Análise do alimento concentrado	32
1.3.	Análise dos conteúdos intestinais.....	32
1.3.1.	Atividade enzimática dos conteúdos intestinais	32
1.3.2.	Viscosidade dos conteúdos intestinais.....	32
2.	Animais e Maneio	33
2.1.	Preparação do alimento composto	33
2.2.	Tratamentos	34
2.2.1.	Animais.....	35
2.2.2.	Instalações	36

2.2.3.	Registos.....	37
2.2.4.	Abates.....	37
3.	Análise estatística	37
Capítulo IV – Resultados e Discussão		38
1.	Determinação da atividade endógena da cevada.....	38
1.1.	Introdução	38
1.2.	Resultados	38
1.3.	Discussão	39
2.	Efeito da suplementação multi-enzimática em dietas à base de cevada, em diferentes alturas do seu crescimento	40
2.1.	Introdução	40
2.2.	Resultados	40
2.2.1.	Desempenho produtivo dos animais	40
2.2.2.	Atividades enzimáticas.....	44
2.3.	Discussão	45
Capítulo V – Conclusão		49
Capítulo VI - Referências Bibliográficas.....		50
Anexo 1 -	Necessidades Nutricionais de Frangos de Carne	61
Anexo 2 -	Reagentes e Soluções.....	63

Índice de Figuras

Figura 1 - Consumo de carne em Portugal em 2011	2
Figura 2 - Evolução da Produção Aves em Portugal, entre 2004 e 2011	3
Figura 3 – Produção de Carne, em milhões de toneladas, na União Europeia, entre 1996 e 2011	4
Figura 4 – Consumo de Carne, em Kg/habitante/ano, na União Europeia, entre 1996 e 2011	5
Figura 5 e 6 – Exemplo de uma instalação de um sistema intensivo e de um sistema extensivo de produção, respetivamente	6
Figura 7 – Aparelho digestivo do frango	9
Figura 8 - Esquema simplificado da estrutura da parede celular evidenciando o arranjo e a forma como interatuam os seus componentes	12
Figura 9 - Estrutura da celulose. Polímero composto por moléculas de glucose ligadas por ligações β -1,4.....	13
Figura 10 – Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e as regiões amorfas	13
Figura 11 – Estrutura básica do xilano	14
Figura 12 – Estrutura básica do arabinoxilano.....	15
Figura 13 – Estrutura básica dos β -glucanos.....	15
Figura 14 – Estrutura Básica do xiloglucano.....	16
Figura 15 – Principais grupos que compõem os polissacáridos não amiláceos.....	19
Figura 16 – Estrutura do Consumo de Matérias-Primas em Portugal, em 2011	21
Figura 17 – Estrutura do Consumo de Matérias-Primas e na União Europeia em 2011 ..	21
Figura 18 – Balanço de Aprovisionamento de cereais em Portugal.....	22
Figura 19 – Evolução da Utilização da cevada como matéria-prima para os alimentos compostos para animais.....	23
Figura 20 – Representação de um grão de cevada	24
Figura 21 – Esquema representativo da forma de administração da dieta controlo (sem suplementação enzimática comercial) e dos grupos teste (com suplementação enzimática comercial durante os vários períodos de tempo)	35
Figura 22 – Representação da sala e distribuição dos tratamentos por gaiolas	36
Figura 23 – Aspeto da sala usada para a realização do Ensaio	37
Figura 24 – Avaliação qualitativa, através do teste do vermelho do Congo, da atividade β -glucanásica de amostras recolhidas de animais alimentados com dietas à base de cevada do tratamento CN.....	45

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Produção de carne de aves (milhares de ton) no Mundo, durante 2009 e 2010	4
Tabela 2 – Composição Nutricional de 179 amostras de cevada.....	25
Tabela 3 - Composição e nível estimado de nutrientes do alimento concentrado base....	33
Tabela 4 - Composição química obtida do alimento concentrado base.....	34
Tabela 5 – Tratamentos em estudo	34
Tabela 6 - Atividade enzimática endógena e viscosidade dos vários lotes de cevada recolhidos e analisados para o ensaio.....	39
Tabela 7 – Resultados da performance dos animais (acumulado semanalmente) alimentados com uma dieta à base de cevada, não suplementadas (CN) ou suplementadas com um complexo enzimático comercial durante os primeiros 11 dias (CP11), os primeiros 23 dias (CP23) ou durante todo o ensaio experimental (CP35)	41
Tabela 8 - Resultados da performance dos animais (na mudança de regime para a ausência de suplementação) alimentados com uma dieta à base de cevada, não suplementadas (CN) ou suplementada com um preparado enzimático comercial durante os primeiros 11 dias (CP11), os primeiros 23 dias (CP23) ou durante todo o ensaio experimental (CP35).....	42
Tabela 9 – Peso e comprimento relativo do trato gastrointestinal e viscosidades das amostras dos conteúdos digestivos dos animais alimentados com uma dieta à base de cevada, não suplementada (CN) ou suplementada com uma enzima comercial durante os primeiros 11 dias (CP11), os primeiros 23 dias (CP23) ou durante todo o ensaio experimental (CP35).....	43
Tabela 10 – Detecção qualitativa da atividade β -glucanásica dos conteúdos digestivos colhidas dos compartimentos gastrointestinais de 48 frangos alimentados com uma dieta à base de cevada, não suplementada (CN) ou suplementada com uma enzima comercial durante os primeiros 11 dias (CP11), os primeiros 23 dias (CP23) ou durante todo o ensaio experimental (CP35).....	44
Tabela 11 – Necessidade Nutricionais em Percentagem ou por kg de dieta (numa dieta com 90% de Matéria Seca).....	61
Tabela 12 - Necessidade Vitamínicas (numa dieta com 90% de Matéria Seca).....	62

Lista de abreviaturas

% - Percentagem

Abs – Absorvância

ADF - Fibra ácido detergente

ADL - Lenhina ácido detergente

CN – Controlo Negativo

cP - centiPoise

CP – Controlo Positivo

CP11 – Controlo Positivo até aos 11 dias de idade

CP23 – Controlo Positivo até aos 23 dias de idade

CP35 – Controlo Positivo até aos 35 dias de idade

d – dia

EM – Energia Metabolizável

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

g – Grama

GB – Gordura Bruta

GI – Gastrointestinal

GMD – Ganho Médio Diário

hab – habitante

IACA – Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais

IC – Índice de Conversão

ID – Identificação do lote

INE – Instituto Nacional de Estatística

Ing – Ingestão

ISA – Instituto Superior de Agronomia

MS – Matéria Seca

NDF- Fibra neutro detergente

NRC – National Research Council

P – Peso

P(F) – Probabilidade

PB – Proteína Bruta

pH – Simétrico do logaritmo (co-logaritmo) decimal da atividade hidrogeniónica

PNA – Polissacáridos não Amiláceos

PV – Peso Vivo

EPM – Erro Padrão da Média

Tampão PC - Tampão Fosfato-Citrato

TGI – Trato Gastrointestinal

Tris – 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

UTL – Universidade Técnica de Lisboa

xg – Força Centrifuga Relativa

β -glucano - β -(1,3)(1,4)-glucano

Lista de símbolos

°C – Graus Celsius

cm/kg PV – Centímetro por quilograma de peso vivo

g/kg – Grama por quilograma

g/kg PV – grama por quilograma de peso vivo

h – horas

m – Metro

M – Molar

m² – Metro quadrado

mg - Miligramma

mM – Milimolar

p/v – Peso por volume

Ton - Toneladas

U/kg – Unidades Enzimáticas por quilograma

kg – Quilograma

kg/hab./ano – Quilograma por habitante por ano

mg – Miligramma

mL – Mililitro

Capítulo I - Introdução

O dinamismo do sector avícola atual reflete-se nos atuais padrões de consumo (Nacional e Europeu) de proteína animal e depende do continuo melhoramento dos sistemas de produção, com o objetivo de obter produtos com elevadas características nutricionais, e a custos reduzidos. Para tal é necessário um conhecimento aprofundado das necessidades nutricionais dos animais e das características dos alimentos utilizados, bem como dos suplementos que podem ser usados para melhorar o aproveitamento dos mesmos.

As dietas para frangos de carne são geralmente baseadas em cereais, em primeiro lugar o milho, mas em alguns casos pode ser utilizado o trigo ou a cevada, dependendo primariamente da sua disponibilidade e dos seus preços.

Tanto o trigo como a cevada são ricos em polissacáridos não amiláceos solúveis, que afetam a digestibilidade dos nutrientes e a ingestão alimentar. Assim, o estômago simples destes animais não está capacitado para degradar os polissacáridos das paredes celulares vegetais, necessitando-se recorrer a enzimas exógenas que permitam a sua degradação.

Para melhor entender o impacto da utilização de enzimas em dietas à base de cevada, administradas a frangos de carne, realizou-se um ensaio experimental, em que se testou a resposta dos animais à suplementação enzimática em diferentes períodos do seu ciclo de crescimento. Pretendendo-se assim averiguar qual o melhor período para se fazer a referida suplementação permitindo-se com isso manter a eficácia enzimática e reduzindo-se os custos.

Este trabalho está dividido em 3 capítulos principais. O primeiro capítulo refere-se à Revisão Bibliográfica e neste é focada: 1) a caracterização do sector avícola, 2) a produção de cereais e a sua importância na alimentação de frangos de carne (especialmente a cevada), 3) as paredes celulares vegetais, desde a sua composição às diferentes estratégias e mecanismos de degradação das mesmas e 4) as enzimas com impacto na alimentação de frangos, quando adicionados a dietas à base de cevada. No capítulo seguinte são referidos todos os procedimentos efetuados ao longo deste trabalho. Por fim, o último capítulo consiste na apresentação de todos os resultados obtidos e na discussão dos mesmos.

Todos estes capítulos são estruturados de modo a comparar os resultados atuais com trabalhos anteriores, para assim tentar compreender melhor a importância e os efeitos da suplementação com um complexo enzimático comercial, em dietas à base de cevada, para frangos de carne.

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

1. Caracterização do sector avícola

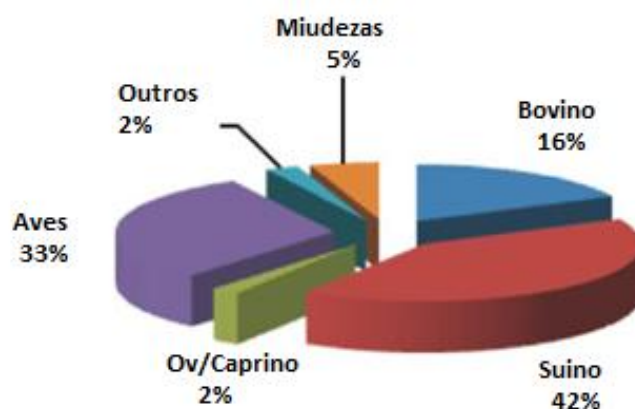
1.1. Breve caracterização económica da avicultura em Portugal e no Mundo

Portugal

Ao longo dos anos, tem-se verificado uma tendência de aumento no consumo de produtos avícolas, face ao decréscimo no consumo de outras carnes, quer em volume, quer em valor monetário. Este crescimento é devido, provavelmente, às características intrínsecas da carne de aves, quando comparada com carnes provenientes de outras espécies animais, como os suínos e ruminantes (MDRP, 2007).

A carne de frango apresenta melhores características nutricionais que as carnes de ruminantes e suínos, tornando esta carne a preferida por muitos consumidores. Entre as várias características destacam-se: o conteúdo proteico de elevada qualidade e facilmente digerível e a gordura e o colesterol mais baixos (Field, 2004). Os frangos de carne caracterizam-se também pelos seus bons desempenhos zootécnicos, como o baixo índice de conversão alimentar (IC), bons ganhos médios diários (GMD), bons rendimentos em carcaça e ciclo produtivo curto e, baixo custo unitário, fazendo com que a sua produção seja vantajosa para os produtores de animais e consumidores, que podem comprar carne por um preço competitivo.

Figura 1 - Consumo de carne em Portugal em 2011



Legenda: Aves =frangos + perus + patos

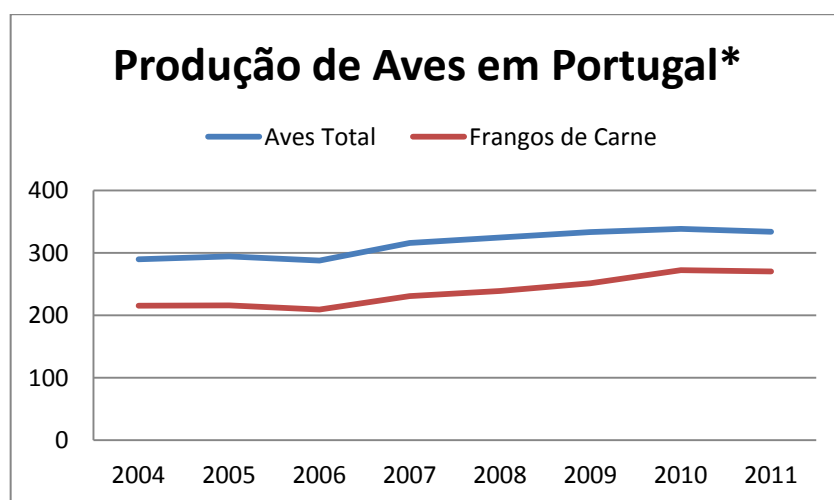
Fonte: IACA (2012)

O consumo de carne de aves, em 2011, ocupou o segundo lugar (33%), a seguir à carne de porco (que domina com 42%), relativamente ao total de carne consumida em Portugal (Figura 1). A carne de frango representou cerca de 81% do consumo de carne de aves, com um consumo *per capita* de 35 kg/hab./ano (INE, 2012).

A produção de carne de aves, em Portugal, representou cerca de 38,9% do total de carnes produzidas, representando cerca de 334 mil toneladas. A carne de frango rondou os 31,5% (270 mil toneladas) (IACA, 2012), como se pode verificar na Figura 2.

Neste panorama, Portugal mostra-se praticamente auto-suficiente na produção de carne de aves, apresentando, em 2011, um grau de auto-aprovisionamento de 92%, ao contrário do que acontece com as outras carnes (IACA, 2012).

Figura 2 - Evolução da Produção Aves em Portugal, entre 2004 e 2011



*Valores em 1000 Ton

Adaptado de IACA (2012) e INE (2012)

Mundo

O rápido crescimento do setor das carnes tem sido impulsionado pelo aumento da procura da carne de aves. Quanto aos outros tipos de carne, o crescimento do consumo *per capita* está estagnado, especialmente de ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos) e de porco. Razões culturais, financeiras ou religiosas podem ser uma das grandes explicações para este aumento. No entanto as baixas capacidades produtivas de alguns países contribuem também para o aumento da escolha deste sector (Tabela 1) (FAO, 2012).

A nível mundial, o consumo anual *per capita* de carne de aves varia substancialmente entre países, oscilando de 0.7 kg na Índia a 44 kg nos Estados Unidos da América (Ravindran, 2010).

Tabela 1 - Produção de carne de aves (milhares de ton) no Mundo, durante 2009 e 2010

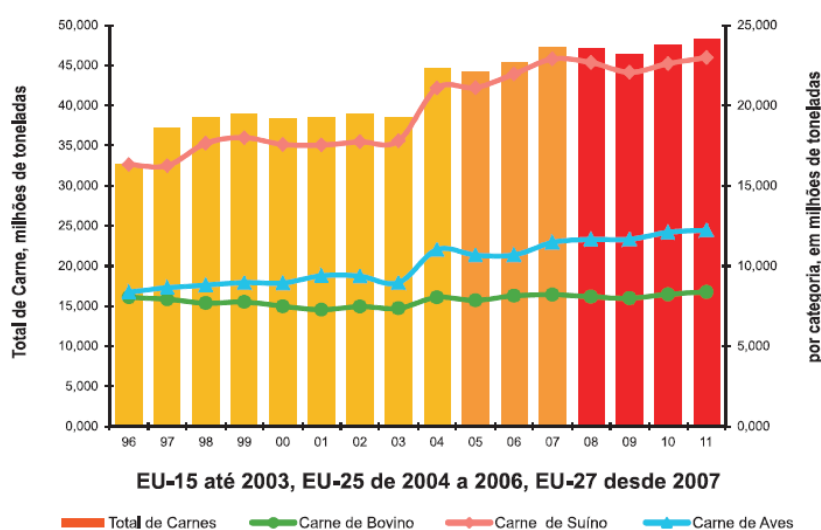
Produção aves (em Milhares de Ton)*	2009	2010
Mundo	94 203	97 942
PAÍSES EM DESENVOLVIMENTO	55 354	58 026
África	4 422	4 638
Ásia	30 937	32 528
América Latina e Caraíbas	19 974	20 835
Oceânia	22	25
PAÍSES DESENVOLVIDOS	38 820	39 887
América do Norte	20 164	20 800
Ásia e Oceânia	2 937	3 014
Europa	15 719	16 073

*Dados de 2009 e 2010 por ausência de dados relativos a 2011

Adaptado: FAO (2012)

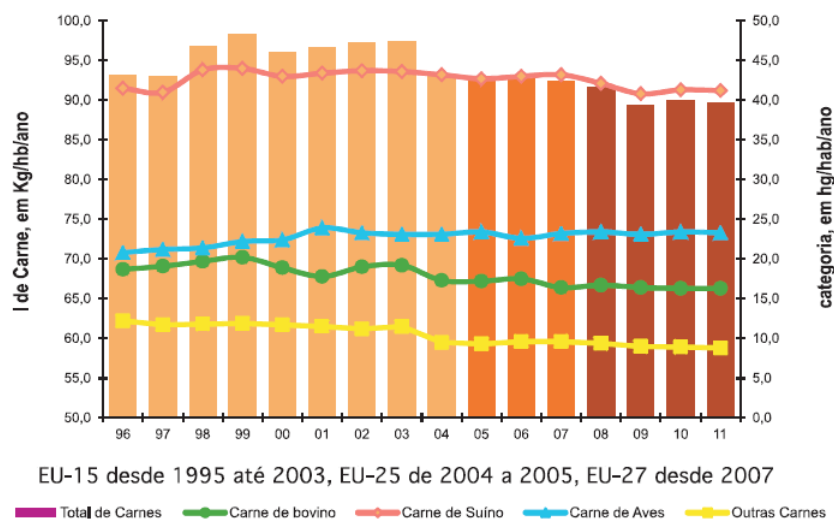
Numa perspetiva Europeia, verifica-se que a produção de carne de aves permanecia estável em 2011, apesar da quebra generalizada do consumo que atingiu todas as outras espécies (IACA, 2012) (Figura 3). O consumo encontra-se em 2º lugar, representando 26% do total, com um consumo *per capita* de 23,3 kg/hab./ano (Figura 4) (IACA, 2012).

Figura 3 – Produção de Carne, em milhões de toneladas, na União Europeia, entre 1996 e 2011



Fonte: IACA (2012)

Figura 4 – Consumo de Carne, em Kg/habitante/ano, na União Europeia, entre 1996 e 2011



Fonte: IACA (2012)

1.2. O Frango de carne

1.2.1. Sistemas de produção

Os sistemas de produção de frangos de carne podem dividir-se em dois modos principais de produção: o sistema intensivo e o sistema extensivo.

O sistema intensivo permite uma maior produção de carne num menor período de tempo (aproximadamente 5-6 semanas) e numa menor unidade de área utilizada. Neste sistema, os frangos encontram-se no interior de pavilhões, no chão, com camas secas e os requisitos nutricionais destas aves são satisfeitos pela administração de alimentos compostos completos especialmente formulados para cobrir as necessidades nutricionais destes animais (Field, 2004).

O sistema extensivo, que engloba os chamados “sistemas alternativos de produção” estão usualmente associados a áreas de acesso dos frangos ao exterior dos pavilhões, pelo menos durante parte do crescimento dos animais. Estes sistemas fornecem várias escolhas ambientais e alimentares, encorajando a atividade física e permitindo uma perceção de maior bem-estar das aves. Por outro lado, têm um maior custo associado, devido à menor densidade animal, maior tempo requerido até ao abate e, ainda, ao maior índice de conversão alimentar. Há, no entanto, um maior valor acrescentado no produto final atribuído a aspetos relacionados com a perceção dos consumidores relativamente à sustentabilidade

do sector, ambiente, saúde e bem-estar animal. Este modelo é muitas vezes escolhido por produtores direcionados a um nicho de mercado alvo, disposto a pagar mais por este tipo de produto (FAO, 2010; Fanatico, 2006).

Figura 5 e 6 – Exemplo de uma instalação de um sistema intensivo e de um sistema extensivo de produção, respetivamente



Fonte: http://dzootecnia.blogspot.pt/2012/07/o-mito-do-uso-de-hormonios-na-producao_12.html;
<http://www.fanpop.com/clubs/chicken/images/1413665/title/free-range-chicken-farm-photo>

Para os vários sistemas de produção de frangos de carne são usadas diferentes raças e/ou estirpes, que foram geneticamente desenvolvidas, de modo a fazer corresponder os melhores atributos de cada uma às condições de produção referidas.

1.2.2. Raças e estirpes

Durante os dois últimos séculos, mais de 300 raças puras e variedades de galinhas foram desenvolvidas, mas poucas sobreviveram face às exigências comerciais atuais (North & Bell, 1990). Atualmente as quatro principais classes de raças são as Americanas, Asiáticas, Inglesas e Mediterrâneas (Field, 2004).

Na sequência desta seleção continuada surgiram as linhas ou estirpes, que resultam de cruzamentos controlados entre diferentes raças e dentro da mesma raça, com características produtivas e nutricionais mais desejáveis pelo produtor e pelo consumidor. O nome de cada estirpe é proveniente da empresa que a desenvolveu, como a Arbor, Ross, Peterson e Hubbard, entre outros. A escolha da estirpe para fins produtivos deve ser feita tendo em conta a sua aptidão produtiva, o sistema e as condições de produção e o tipo de produto desejado.

Nos sistemas intensivos, as estirpes de crescimento rápido são as mais usadas devido ao seu alto potencial de crescimento. Já nos sistemas extensivos são mais habituais estirpes de crescimento lento (Gordon & Charles, 2002; Fanatico *et al.*, 2005). Isto porque se reconhece que há uma melhor adaptação das aves de crescimento lento aos sistemas alternativos e aos longos períodos de produção dos sistemas extensivos (Weeks, Nicols, Sherwin & Kestin, 1994; Castellini, Dal Bosco, Mugnai & Bernardini, 2002). Estes resultados surgem por se verificar uma diminuição na atividade dos animais de crescimento rápido, devido às altas taxas de crescimento e à diminuição da capacidade de andar (Pedersen & Thomsen, 2000). Além disso, aves mais pesadas sofrem maiores mortalidades e há um aumento do risco de problemas cardiovasculares (Sørensen, Su & Kestin, 2000). Há ainda autores que referem que a seleção que tem sido feita para aumentar a velocidade de crescimento reduz as imuno-competências e aumenta a suscetibilidade destes animais a doenças ambientais (Quershi, Hussain & Heggen, 1998; Rauwn *et al.*, 1998; Yunis, Ben-David, Heller & Cahaner, 2000).

1.2.3. Alimentação e manejo

O manejo alimentar dos frangos de carne tem um impacto marcante na produção, sendo um dos fatores determinantes na performance zootécnica dos animais e na qualidade final da carne. Além disso, a alimentação também representa um papel económico muito importante, pois corresponde à maior fatia (cerca de 60%) dos custos totais associados à produção destes animais (Field, 2004; FAO, 2012).

O principal objetivo da alimentação animal é maximizar a produção, a um custo mínimo, fornecendo todos os elementos nutricionais essenciais para satisfazer as necessidades de manutenção, crescimento e produção. Outros fatores de manejo são também necessários, como uma adequada ventilação, densidade populacional e temperatura, um correto programa de iluminação e um adequado manejo sanitário, para a obtenção dos resultados pretendidos (ROSS, 2009; Ferket & Gernat, 2006).

As estirpes modernas de frangos de carne requerem um rigoroso controlo dos parâmetros produtivos, devendo-se ter sempre em conta as limitações das aves no que se refere à síntese de aminoácidos essenciais e vitaminas e à capacidade de digerir a celulose. Assim sendo, as rações fornecidas a estes animais devem ser complexas misturas que incluem, de forma equilibrada, todos os nutrientes que se conhecem ser necessários para a obtenção dos melhores resultados possíveis (McDonald, 1995; Richards & Proszkowiec-Weglarz, 2007).

Nos frangos, a ingestão de alimento é principalmente regulada pelo conteúdo energético do alimento, ou seja, aumentos no conteúdo energético do alimento conduzem a uma redução na ingestão. Assim há uma necessidade acentuada de balancear os níveis energéticos e proteicos fornecidos, assegurando que um alimento com altos níveis de energia fornece também proteína suficiente para suprir as necessidades em aminoácidos (McDonald *et al.*, 1995).

Os valores das necessidades nutricionais destes animais podem ser consultados em publicações especializadas como as do NRC (1994), FEDNA ou ainda nos manuais de manejo de cada estirpe, como por exemplo o da ROSS (2009) (Anexo 1).

O fornecimento de níveis corretos de energia metabolizável (EM) é essencial para as aves, nomeadamente para o crescimento dos tecidos, utilização na atividade física e manutenção da temperatura normal do corpo. A energia é fornecida através da dieta por meio de hidratos de carbono, gorduras e proteínas. O principal grupo de alimentos fornecedores de energia para as aves são os cereais (Lesson & Summers, 2001).

As necessidades proteicas dos frangos são supridas, normalmente, por bagaços de oleaginosas (normalmente de soja). Os aminoácidos, libertados a partir da digestão das proteínas, são essenciais para um rápido e sustentável crescimento das aves já que são os constituintes principais do tecido muscular, do trato gastrointestinal, dos órgãos internos, da pele e das penas (NRC, 1994). Contudo a suplementação, principalmente com lisina e metionina, é indispensável, numa dieta à base de cereais/bagaços de oleaginosas.

O fornecimento, em níveis corretos, de minerais e vitaminas é importante para a boa performance das aves, porque estes são indispensáveis em praticamente todas as funções metabólicas. A carência, de vitaminas e minerais, pode causar desde a diminuição do rendimento produtivo das aves até ao desenvolvimento de afeções adversas e mesmo a morte, com todos os prejuízos económicos daí decorrentes.

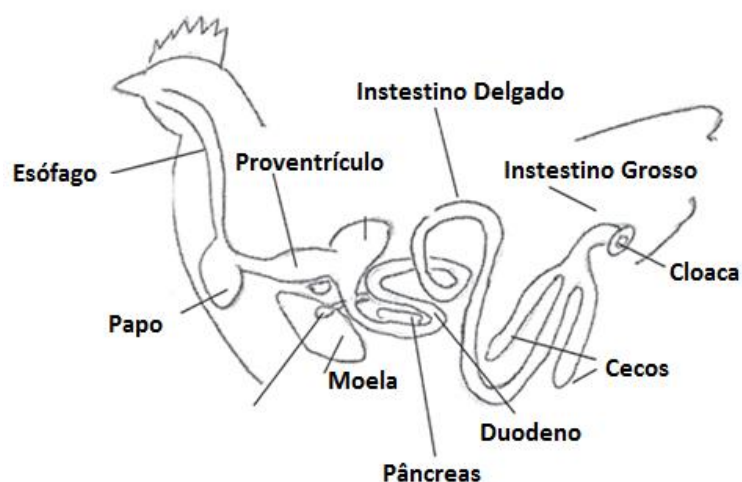
Além de todos os nutrientes a fornecer aos frangos através da dieta, é importante haver água potável *ad libitum*, isenta de organismos patogénicos e com um nível controlado de minerais. Pois a baixa ou nula disponibilidade de água pode comprometer a performance dos frangos.

1.2.4. Fisiologia digestiva e digestão

O aparelho digestivo das aves tem aspetos únicos, quando comparados com os outros animais monogástricos. Este é constituído por bico, boca, glândulas salivares, língua, faringe, esófago, papo, proventrículo, moela, intestinos, cecos, reto e cloaca (Figura 7) (Englert, 1982). Nos frangos, o alimento é ingerido inteiro, armazenado no papo,

fragmentado na moela e a sua digestão depende da ocorrência de secreções digestivas, de forma semelhante ao que acontece nos mamíferos (McDonald *et al.*, 2002). As reações que ocorrem ao longo do trato gastrointestinal, recorrem a órgãos acessórios à digestão (fígado e pâncreas) para a sua produção e libertação de secreções (North & Bell, 1990; Dibner & Richards, 2004).

Figura 7 – Aparelho digestivo do frango



Adaptado de <http://www.backyardchickens.com>

A boca tem como principal função a recolha de alimentos e água mas, como as aves não possuem dentes nem lábios, utilizam o bico e uma língua áspera para apanhar o alimento e o conduzir para o esófago. Na boca, a saliva produzida pelas glândulas salivares, é usada para lubrificar as partículas alimentares de modo a facilitar a sua passagem. Além disso, também possui amilase, que tem a capacidade de iniciar a hidrólise do amido (Englert, 1982; North & Bell, 1990).

O papo é uma dilatação esofágica, em forma de pera, que serve para o armazenamento do alimento. Aqui não são produzidas enzimas, observando-se unicamente a atividade enzimática iniciada pelas secreções salivares da boca e também devido à ativação das enzimas do próprio alimento e a decorrente do desenvolvimento microbiano (North & Bell, 1990; McDonald *et al.*, 2002).

O estômago das aves apresenta dois compartimentos claramente reconhecíveis, o estômago glandular ou proventrículo, seguido do estômago muscular ou moela. No proventrículo é produzida a enzima pepsina e o ácido clorídrico, através de várias glândulas que cobrem as paredes do proventrículo. A pepsina atua na hidrólise de moléculas proteicas

mais complexas e o ácido clorídrico altera o pH dos conteúdos do trato digestivo, provocando, entre outras coisas, a coagulação das proteínas. Como o alimento passa rapidamente através do proventrículo, aqui a digestão do alimento é baixa, mas as secreções passam para a moela, onde a ação enzimática toma importância (Englert, 1982, North & Bell, 1990). A moela encontra-se entre o proventrículo e a parte anterior do intestino delgado. As suas paredes são constituídas por músculos muito grossos e poderosos, que comprimem e trituram os alimentos, tornando-os mais pequenos e mais digestíveis (North & Bell, 1990).

As partículas do conteúdo digestivo, quando são suficientemente pequenas, passam para o intestino delgado. Este órgão pode atingir 1,5 m de comprimento em aves adultas sendo o local principal da digestão e absorção dos alimentos. É constituído pelo duodeno, jejuno e íleo. O duodeno encontra-se em estreito contacto com o pâncreas. O suco pancreático é semelhante ao dos mamíferos, contendo várias enzimas como as amilases, lipases e enzimas proteolíticas, permitindo a digestão de hidratos de carbono, lípidos e proteínas. Esta digestão, que começa no duodeno prolonga-se até ao jejuno e é neste que acaba por ocorrer a maior parte da absorção de nutrientes (McDonald *et al.*, 2002). No epitélio do íleo também são produzidas enzimas e aqui, a maioria da digestão fica completa (North & Bell, 1990).

Alguns dos processos da digestão podem continuar no intestino grosso, contudo nenhuma enzima endógena é produzida nesta porção, ou seja, a digestão é meramente a continuação do processo iniciado no intestino delgado a que se associa a digestão microbiana, embora rudimentar (North & Bell, 1990).

Na junção entre o intestino delgado e o grosso encontram-se os cecos. Nos cecos prossegue a fermentação das frações mais resistentes do alimento por ação da flora microbiana. Nesta porção do TGI também ocorre a degradação parcial da celulose, mas devido à limitada capacidade dos cecos, a hidrólise dos polissacáridos estruturais é relativamente modesta (North & Bell, 1990).

Órgãos acessórios à digestão

Certos órgãos estão estreitamente associados à digestão porque as suas secreções entram no trato intestinal e ajudam no processamento do material alimentar. Os dois órgãos adjacentes ao sistema digestivo são o fígado e o pâncreas.

No fígado é produzida a biliar, um líquido verde e alcalino que é armazenado na vesícula biliar. A principal função da biliar é emulsionar as gorduras para que elas possam ser

digeridas. A bÍlis é descarregada no intestino delgado mais precisamente no duodeno (North & Bell, 1990).

O pâncreas encontra-se intimamente associado ao duodeno, na chamada an a duodenal (Englert, 1982).   uma glândula que segrega suco pancreático, constituído por enzimas tais como a tripsina, am lase e lípase, que depois passam para o interior do duodeno e que são capazes de hidrolisar proteínas, hidratos de carbono e lípidos. O pâncreas também tem um papel fundamental como regulador do metabolismo da glucose, através da secreção de insulina e de glucagon (North & Bell, 1990).

2. Parede Celular Vegetal

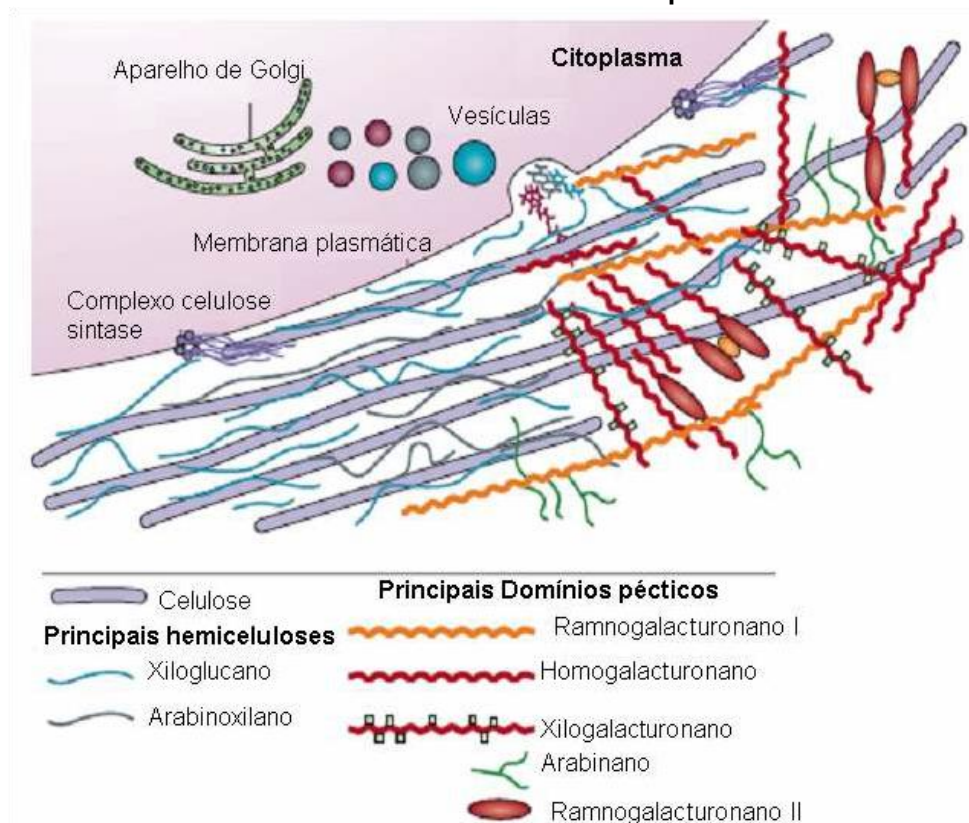
2.1. Estrutura da parede celular

A parede celular das plantas desempenha múltiplas funções dentro das quais se distinguem: o suporte estrutural e formato da célula, a proteção contra agentes patog nicos e combate à desidratação, o armazenamento e a libertação de moléculas sinalizadoras e o armazenamento de hidratos de carbono, de iões met licos e de outros materiais (Cosgrove, 1999).

As paredes celulares vegetais são constituídas por três camadas: a parede celular primária, a parede celular secundária e a lamela média. Estas camadas diferem na sua função e composição. A lamela média é a primeira camada a ser formada, aquando da divisão celular e   constituída principalmente por substâncias pécticas (Prade, 1999). A parede celular primária surge após o fim da formação da lamela média. Esta parede acompanha o crescimento e a divisão da célula, providenciando força mecânica mas permitindo que as paredes se expandam, sendo predominantemente organizada por microfibrilhas de celulose e hemiceluloses (xilanos, arabinoxilanos, arabinanos, galactanos, arabinogalactanos, galactoglucomananos, xiloglucanos e glucanos de ligações tipo β -1,3 e β -1,4) (Figura 8).

Em contraste, a parede secundária é a mais forte e   depositada unicamente quando as células cessam o crescimento, e cont m celulose, lenhina, cutina e por vezes sub rina (Brett & Waldron, 1996).

Figura 8 - Esquema simplificado da estrutura da parede celular evidenciando o arranjo e a forma como interatuam os seus componentes



Adaptado de Cosgrove (2005)

2.2. Composição da parede celular vegetal

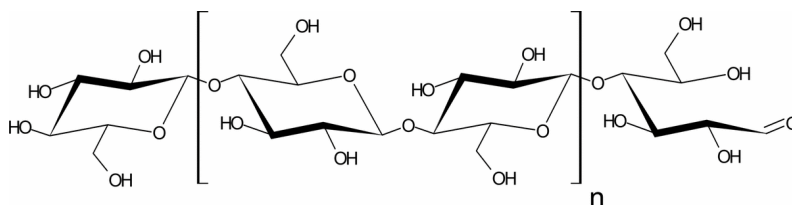
A parede celular vegetal é uma estrutura complexa, composta por microfibrilas de celulose rodeadas por uma matriz de diversas moléculas, das quais as mais importantes são as hemiceluloses, pectinas, glicoproteínas e substâncias aromáticas com características cerosas (Ferreira & Fernandes, 1992; Cosgrove, 2001). Estas estruturas não têm uma composição exata, pois varia consoante o tipo de planta, com o estado de desenvolvimento da mesma e com o tecido em questão, assim como com as condições edafo-climáticas onde a planta se desenvolve (Smits & Annison, 1996; Heredia, Jimenes & Guillen, 1995).

2.2.1. Celulose

A celulose é o principal constituinte das paredes celulares das plantas e é o composto orgânico mais abundante da superfície terrestre (Leeson & Summers, 2001). Este glúcido estrutural é um polissacárido linear formado por monómeros de β -D-glucose, sob a forma de anel piranósico, unidos entre si por ligações glicosídicas β -1,4 (Cosgrove, 2005). Cada resíduo de glucose presente sofre uma rotação de 180° em relação ao eixo do polímero e

aos resíduos imediatamente adjacentes, constituindo uma unidade de celobiose (Béguin & Aubert, 1994) (Figura 9).

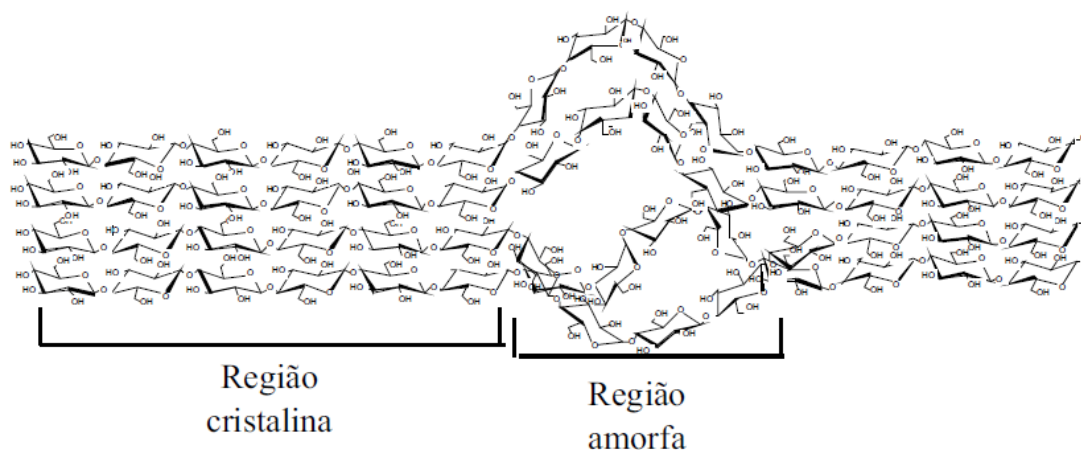
Figura 9 - Estrutura da celulose. Polímero composto por moléculas de glucose ligadas por ligações β -1,4



Adaptado de <http://www.biochemj.org/bj/385/0527/bj3850527.htm>

As cadeias lineares de celulose encontram-se por sua vez ligadas entre si, por meio de numerosas pontes de hidrogénio ao nível inter e intramolecular, formando as microfibrilhas de celulose (Ferreira & Fernandes, 1993; Lynd *et al.*, 2002). As fibras de celulose são constituídas por regiões cristalinas, altamente ordenadas, impermeáveis à água e mais resistentes à degradação química e biológica, e regiões desordenadas denominadas de amorfas ou não cristalinas (Attala, 1993) (Figura 10).

Figura 10 – Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e as regiões amorfas



2.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolímeros amorfos altamente ramificados que estão intimamente associados à celulose e à lenhina, sendo o segundo principal componente das paredes celulares das plantas (Thompson, 1993). Estes polissacáridos são formados por ligações 1,4- β -D-piranosil com orientação O1-4, mas não apresentam uma composição

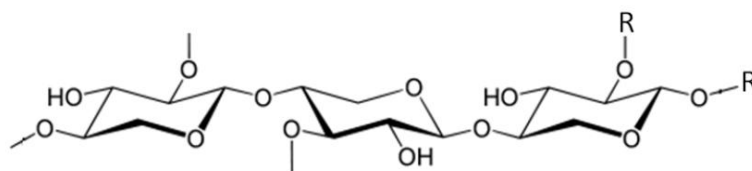
química homogênea. As hemiceluloses caracterizam-se pela elevada ramificação da sua cadeia principal e são geralmente classificados de acordo com os resíduos de açúcares presentes na cadeia principal, tais como o xilano, arabinanos, mananos, glucanos e galactanos, que possuem unidades repetidas de xilose, arabinose, manose, glucose e galactose, respetivamente. As hemiceluloses mais representativas nas paredes celulares vegetais inserem-se nos seguintes grupos: os xilanos, os xiloglucanos, os mananos, os galactoglucomananos, os arabinanos e os galactanos (Waldron, Parker & Smith, 2003)

2.2.2.1. Xilanos

Os xilanos (Figura 11) são os polissacáridos hemicelulósicos mais comuns nas paredes celulares das gramíneas e de plantas lenhosas (Cosgrove, 2005). Consistem numa cadeia principal constituída por unidades de β -D-xilopirranose, unidas por ligações xilosídicas β -1,4, sendo a unidade repetida a xilobiose, e possui uma estrutura ramificada, apresentando regularmente o C2 substituído por uma unidade de ácido α -4-O-metilglucurónico ou por α -L-arabinofuranose nas posições C2 ou C3 (Heredia *et al.*, 1995). O ácido glucurónico e o éter 4-O-metil estão ligados à cadeia do xilano por ligações do tipo α -1,2. Igualmente, é possível encontrar as posições C2 e/ou C3 acetiladas (Coughlan e Hazlewood, 1993), além de se encontrarem, também, alguns componentes fenólicos, tais como os anéis aromáticos dos ácidos ferúlico e p-cumárico, a substituir o C5 nas cadeias de α -L-arabinofuranose (Singh, Madlala & Prior, 2003). Os grupos acetil podem ligar-se aos grupos O-2 e O-3 das unidades de xilose constituintes da cadeia principal do xilano, mas o grau de acetilação difere grandemente entre xilanos de origens diferentes.

Os xilanos constituem o principal componente de interfase entre a lenhina e os outros componentes glucídicos da parede vegetal e são um grupo de polissacáridos muito heterogéneo.

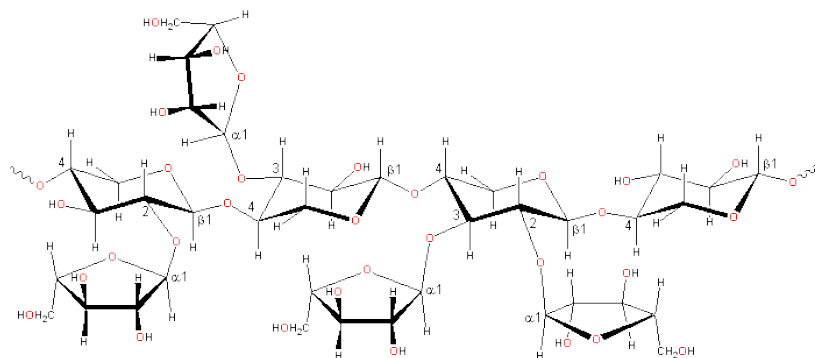
Figura 11 – Estrutura básica do xilano



Os xilanos, predominantes nos cereais que são mais utilizados na alimentação animal, como é o caso do trigo, encontram-se fortemente decorados por resíduos de L-arabinose nas posições α -2 e α -3, assumindo, assim, a designação de arabinoxilanos. Os arabinoxilanos

(Figura 12), também designados por pentosanos, são compostos predominantemente por duas pentoses, arabinose e xilose e, a sua estrutura molecular consiste num esqueleto linear de xilose com ligações β -1,4, com arabinoses ligadas aos carbonos 3 e 4 das moléculas de xilose (Choct, 1997).

Figura 12 – Estrutura básica do arabinoxilano

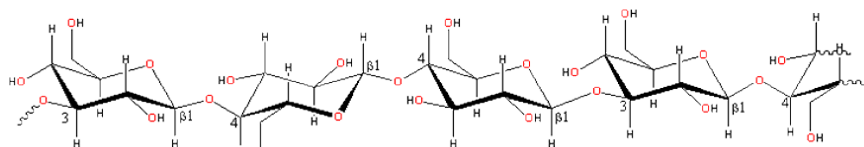


Fonte: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyara.html>

2.2.2.2. β -glucanos

Em alguns cereais, tais como a cevada e a aveia, os β -glucanos prevalecem (Figura 13) (Bedford, 1995; Barnes, Miller & Nelson, 1995; Chesson, 1993). Os β -glucanos são constituídos por uma cadeia linear de unidades de glucose unidas por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4, que representam, respetivamente, 30% e 70% das ligações presentes (Choct, 1997). A incorporação das ligações β -1,3 quebra a estrutura normal das cadeias β -1,4, evitando um alinhamento das moléculas, fazendo com que as suas propriedades sejam totalmente diferentes da celulose, e a sua ligação por pontes de hidrogénio tornam o polímero mais solúvel (Choct, 2006).

Figura 13 – Estrutura básica dos β -glucanos

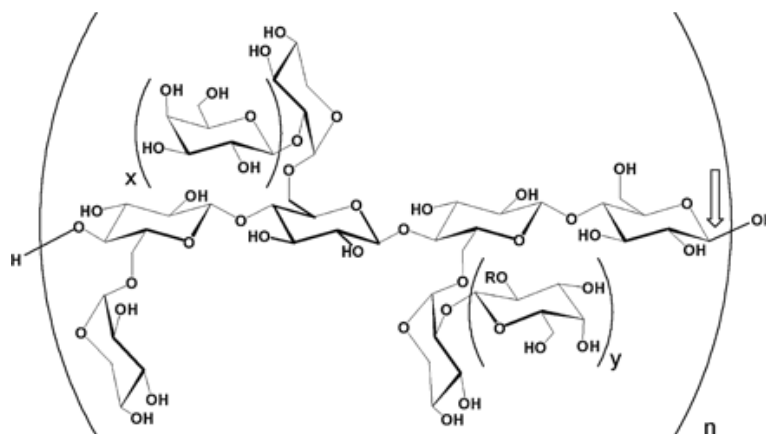


(Fonte: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hygly.html>)

2.2.2.3. Xiloglucanos

Os xiloglucanos (Figura 14) são as hemiceluloses predominantes nas paredes celulares primárias das dicotiledóneas, representando 15-25% da sua matéria seca (Carpita & Gibeaut, 1993). O xiloglucano consiste numa cadeia principal de moléculas de glucose semelhante a celulose. Contudo, este hidrato de carbono encontra-se ramificado em vários pontos com moléculas de xilose por ligações do tipo α -1,6.

Figura 14 – Estrutura Básica do xiloglucano



Fonte: glycob.oxfordjournals.org/content/16/12/1171/F8.expansion.htm

2.2.2.4. Outros compostos hemicelulósicos

Outros componentes hemicelulósicos incluem os mananos, os glucomananos, os galactanos e os arabinogalactanos.

Os mananos podem apresentar-se como uma estrutura linear de unidades de manose unidas entre si por ligações glicosídicas β -1,4, ou podem apresentar-se como uma estrutura heteropolimérica com unidades de manose associada a unidades de glucose por ligações β -1,4, formando o glucomanano. Tanto a cadeia de manano puro como o glucomanano são frequentemente decorados por unidades de galactose unidas à cadeia principal por ligações α -1,6, assumindo assim a designação de galactomananos ou galactoglucomananos, respetivamente (Hogg *et al.*, 2003).

Os galactanos são polímeros de unidades de galactopirranose, unidos por ligações β -1,4. Estes polímeros podem encontrar-se decorados com cadeias laterais de arabinose constituindo os arabinogalactanos (Gibeaut & Carpita, 1994).

2.2.3. Pectinas

As pectinas são polissacáridos estruturalmente heterogêneos, compostos por um elevado número de polímeros baseados no ácido D-galacturónico, com ligações do tipo α -1,4 (Selvedran, 1985). As suas principais funções são: determinação da porosidade da parede celular e controlo do trânsito de macromoléculas, adesão celular, hidratação através da formação de géis, plasticidade e flexibilidade da parede durante o crescimento e participação em mecanismos de defesa da planta ao ataque de organismos patogénicos (Jarvis, 1984).

A estrutura química das pectinas é representada por dois tipos de polímeros, os galacturonanos, cuja cadeia principal é formada por resíduos de ácido galacturónico unidos entre si por ligações α -1,4, e os ramnogalacturonanos, formados por resíduos alternados de ácido galacturónico e ramnose.

Entre os galacturonanos mais característicos encontram-se o homogalacturonano, o xilogalacturonano, o apiogalacturonano e o denominado ramnogalacturonano II. O homogalacturonano é um polímero linear de unidades de ácido D-galacturónico com ligações α -1,4, podendo as unidades estarem acetiladas ou metiladas (Vries e Visser, 2001). O ramnogalacturonano II é um polímero de baixo peso molecular e a sua estrutura é altamente complexa, apresentando uma cadeia constituída por 7 a 12 resíduos de ácido galacturónico com ligações α -1,4, ramificadas em quatro locais diferentes com oligossacáridos (Ridley, O'Neill & Mohnen, 2001).

O segundo grupo de polímeros constituintes da pectina corresponde aos ramnogalacturonanos. Um dos ramnogalacturonanos mais estudados é o ramnogalacturonano I (RGI), que é constituído por unidades repetidas do dissacárido [(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-ácido galactosilurónico] (Willats, McCartney, Mackie & Knox, 2001).

2.2.4. Outros componentes das paredes celulares

Além dos polissacáridos, as paredes celulares contêm outros componentes, tal como a lenhina, as ceras vegetais e as cutinas e minerais.

A lenhina é o terceiro composto orgânico mais abundante no reino vegetal. É um composto polifenólico com uma estrutura complexa, constituído essencialmente por três álcoois aromáticos: álcool *p*-hidroxinamílico, *p*-coniferílico e *p*-sinapílico (Bonawitz & Chapple, 2010; Minic & Jouanin, 2006). A lenhina tem a capacidade de proteger a celulose e as hemiceluloses da hidrólise enzimática, pois é muito resistente à degradação biológica (Beguin e Aubert, 1994).

As ceras vegetais e as cutinas são outros dos compostos presentes na parede celular vegetal e possuem uma função predominantemente protetora. São principalmente ésteres de monoálcoois de elevado peso molecular com ácidos gordos saturados.

Por último, inserem-se os minerais dos quais importa destacar a sílica (Ferreira e Fernandes, 1993).

2.3. Modelos das paredes celulares vegetais

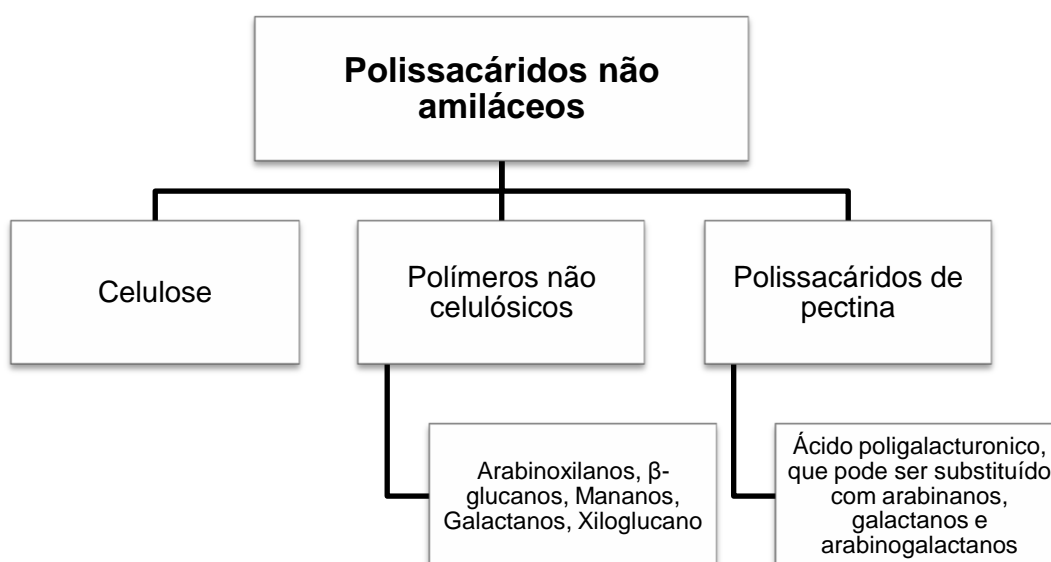
Vários modelos têm sido propostos para explicar a organização das paredes celulares vegetais e as interações estabelecidas entre os seus componentes. Nos anos 70, Keegstra *et al.* (1973) propuseram que polímeros da matriz (xilano, xiloglucano, polissacáridos pécticos e proteínas estruturais) estão covalentemente ligados para formar uma rede macromolecular gigante, que fornece força às paredes. Neste modelo, as fibras de celuloses estão conectadas através de ligações de hidrogénio às cadeias de xiloglucano (Cosgrove, 2001). Mais tarde, um modelo alternativo, proposto por Hayashi (1989) e Fry (1989), defendeu que as microfibrilhas de celulose podem estar diretamente presas às cadeias de xiloglucano, atuando como uma corrente entre as microfibrilhas, que reforça as paredes celulares. Além da estrutura de xiloglucano-celulose, encontra-se uma matriz amorfa de pectina e glicoproteínas estruturais, preenchendo os espaços entre as cadeias de xiloglucano, mas sem constituírem ligações covalentes ao mesmo. Apesar deste ser o mais popular, dois outros modelos foram propostos posteriormente. No primeiro modelo, proposto por Talbott e Ray (1992), cada microfibrilha de celulose está revestida com camadas sucessivamente mais finas da matriz de polissacáridos. Além disso, a ligação entre as microfibrilhas é feita indiretamente através de ligações não-covalentes entre camadas de polissacáridos distintas. No segundo modelo, Ha *et al.* (1997), é referido que as camadas de celulose e hemicelulose estão separadas por polissacáridos de pectina.

Os diferentes modelos descritos salientam aspetos importantes da estrutura da parede celular, que são úteis para fornecer uma ideia de como é formada esta complexa estrutura. Até ao momento, não parece haver nenhuma evidência definitiva que favoreça um determinado modelo sobre os outros (Cosgrove, 2001), portanto todos os modelos devem ser considerados para a interpretação da arquitetura e dos processos que conduzem às modificações da parede celular. No entanto, todos os modelos mais recentes, da parede celular de plantas, descrevem a parede como uma rede de redes estruturalmente independentes (a rede de celulose-hemicelulose, a rede de pectina), mas com interação, e em todos os modelos, as microfibrilhas de celulose são revestidas com xiloglucano (Carpita & Gibeaut, 1993; Cosgrove, 2001).

2.4. Efeitos dos polissacáridos não amiláceos (PNA) na alimentação de frangos de carne

Os polissacáridos estruturais das paredes celulares vegetais são normalmente denominados por polissacáridos não amiláceos (PNA) e constituem uma larga variedade de moléculas com uma estrutura muito diversificada (Williams, Geraert, Uzu & Annison, 1997). Estes são classificados em três grupos principais: celulose, polímeros não-celulósicos (hemicelulose) e polissacáridos de pectina (Heredia *et al.*, 1995) (Figura 15).

Figura 15 – Principais grupos que compõem os polissacáridos não amiláceos



Adaptado de Choct (1997)

Os PNA podem ser insolúveis e solúveis em água. Tanto os insolúveis como os solúveis podem ser parcialmente indigestíveis, podendo exercer alguns efeitos prejudiciais na nutrição dos frangos (Carré, Derouet & Leclercq, 1990). Os principais efeitos prejudiciais reportados pelos PNA insolúveis são o encapsulamento dos nutrientes (Hesselman & Åman, 1986; Pettersson & Åman, 1989), a capacidade de absorver grandes quantidades de água e de manter a sua integridade durante a passagem através do trato gastrointestinal. Deste modo, atuam como uma barreira física para a ação digestiva das enzimas, como a amilase e a protease, reduzindo a eficiência da digestão de proteínas e hidratos de carbono na parte superior do intestino (Hesselman & Åman, 1986; Choct, 2001).

Os PNA solúveis, como os arabinoxilanos e β -glucanos, estão normalmente associados com o aumento da viscosidade dos conteúdos digestivos e, conseqüentemente, com a redução na taxa de passagem e modificações fisiológicas e morfológicas do trato gastrointestinal. Além disto, também dificulta a interação das enzimas digestivas com o alimento por formarem uma barreira entre estas e os seus respectivos substratos (Smits & Anniston, 1996; Choct, 1997; Edwards, Johnson & Read, 1988; Ikegami *et al.*, 1990).

A baixa taxa de passagem dos conteúdos gastrointestinais resulta na proliferação de microflora fermentativa anaeróbica nos compartimentos superiores do trato gastrointestinal (Wagner & Thomas, 1978; Vahouny, 1982). Esta microflora pode interagir com algumas proteínas e formar complexos que limitam a digestão de nutrientes e a disponibilidade de proteínas para as aves (por competição com o hospedeiro pelos nutrientes) (Vahouny *et al.*, 1981; Bedford, 1995). Angkanaporn *et al.* (1994) mostraram que os PNA solúveis aumentam marcadamente as perdas de aminoácidos nos frangos a nível intestinal. Além disso, certos PNAs podem ligar-se aos sais biliares, lípidos e colesterol, podendo, assim, influenciar o metabolismo dos lípidos no intestino (Vahouny *et al.*, 1981). Estes efeitos podem conduzir a maiores mudanças nas dinâmicas digestivas e de absorção do intestino, que conseqüentemente conduzem a uma menor eficiência na assimilação de nutrientes pelos animais, (Angkanaporn *et al.*, 1994).

Por fim, vários estudos demonstram que as aves que ingerem altos níveis de PNA tendem a apresentar mudanças adaptativas do sistema digestivo, refletindo-se no aumento ponderal dos órgãos digestivos (Pettersson & Åman, 1989; Viveros, Brenes, Pizarro & Castaño, 1994; Yu, Hsu & Chiou, 1998). Modificações histológicas do jejuno, assim como a diminuição e atrofia da vesícula biliar e aumento do peso e tamanho do íleo são reportadas em aves alimentadas com altas concentrações de PNA nas dietas (Viveros *et al.*, 1994; Yasar e Forbes, 1999; Steenfeldt, 2001).

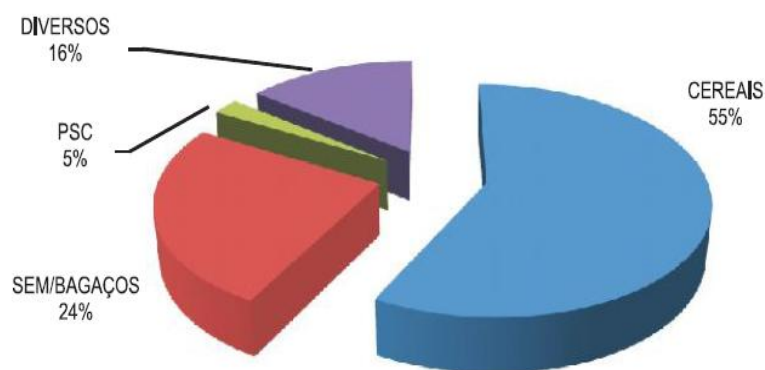
Em resumo, os PNAs encontrados nas dietas dos frangos contribuem diretamente para prejudicar o crescimento, eficiência do índice de conversão alimentar e a digestibilidade de nutrientes (Classen *et al.*, 1985; Bedford & Classen, 1992). Contudo, é geralmente reconhecido que os efeitos dos polissacáridos são menos prejudiciais em animais adultos do que em animais jovens (Steenfeldt, 2001; Pirgozliev *et al.*, 2003; Carré *et al.*, 2007; Barteczko, Augustyn, Lasek & Smulikowska, 2009). De facto, com a idade, os animais tendem a adaptar-se e a utilizar os PNA mais eficientemente atribuída a uma maior produção de enzimas digestivas (Petersen *et al.*, 1999). Assim sendo, a digestão dos PNAs dependem do animal (presença da microflora capaz de os digerir), solubilidade dos mesmos, estrutura química e quantidade de polissacáridos fornecidos na dieta (Choct *et al.*, 1996).

3. Cereais

Os principais constituintes dos alimentos compostos para frangos de carne são os cereais, normalmente incorporados numa taxa que varia entre 40 a 60%, mas a formulação deve ser adequada à idade dos animais e ao produto final desejado em termos de peso final e idade de abate, a fim de se obterem as melhores margens de lucro possíveis (ROSS, 2009). Como tal, o consumo, a produção e o preço dos cereais são fatores importantes a considerar na produção de frangos de carne.

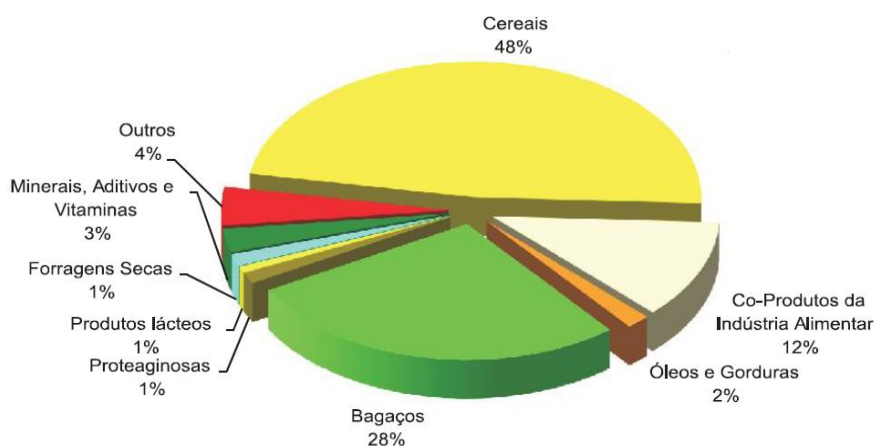
A estrutura do consumo de matérias-primas em Portugal e na Europa, para a produção de alimentos compostos para animais, encontram-se esquematizados nas Figuras 16 e 17.

Figura 16 – Estrutura do Consumo de Matérias-Primas em Portugal, em 2011



Fonte: IACA (2012)

Figura 17 – Estrutura do Consumo de Matérias-Primas na União Europeia em 2011



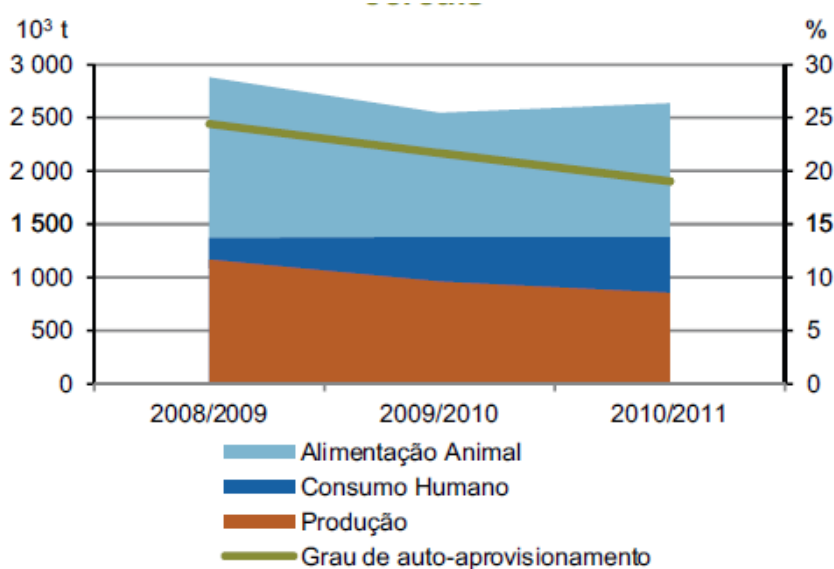
Fonte: IACA (2012)

Em 2011, do fabrico total de alimentos compostos, a produção destinada à alimentação de aves foi de 41% e 34%, em Portugal e na União Europeia, respetivamente (IACA, 2012).

Verificou-se, também, que cerca de 59% do consumo de cereais registado, em Portugal, na campanha 2010/2011 teve como destino a alimentação animal (com maior peso o sector avícola) e que apenas 31% se destinou à alimentação humana (INE, 2012b).

No entanto, a produção nacional de cereais não foi suficiente para qualquer destes destinos, dado que, neste período, a produção rondou, em média, 19% do consumo interno, com uma importância de cerca de 1 378 000 toneladas, como se pode verificar na Figura 18 (INE, 2012b).

Figura 18 – Balanço de Aprovisionamento de cereais em Portugal



Fonte: INE (2012b)

Dos vários cereais utilizados em alimentação de aves, em Portugal, o principal é o milho (IACA, 2012) devido às suas características nutricionais (o seu elevado conteúdo em amido e o baixo teor de fatores anti-nutritivos) e ao seu custo. No entanto, em algumas épocas o seu preço pode ser elevado, levando a que este possa ser muitas vezes substituído por trigo, sorgo ou cevada.

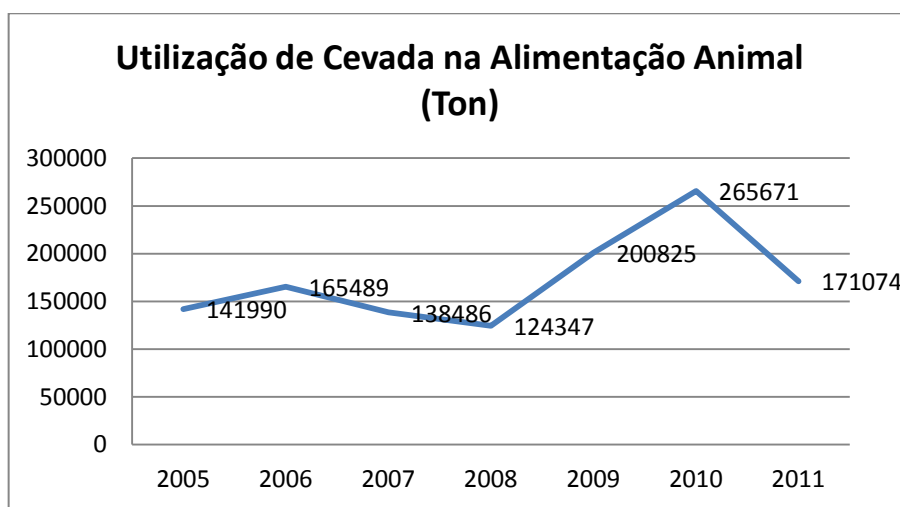
3.1. A cevada na alimentação de aves

A cevada é um cereal da família das gramíneas e género *Hordeum*. O género *Hordeum* é composto por 32 espécies, sendo a mais conhecida a espécie dística (*Hordeum distichum*), mas a espécie mais utilizada na alimentação animal é a espécie forrageira (*Hordeum hexastichum*).

3.1.1. Consumo e produção de cevada em Portugal e na Europa

Em Portugal, a cevada é a terceiro cereal mais consumido pela indústria de alimentos compostos para animais, depois do milho e do trigo. A utilização desta matéria-prima rondou, em 2011, os 10%, com um quantitativo de 171 074 toneladas (Figura 19) (INE, 2012b; IACA, 2012).

Figura 19 – Evolução da Utilização da cevada como matéria-prima para os alimentos compostos para animais



Adaptado de IACA (2012)

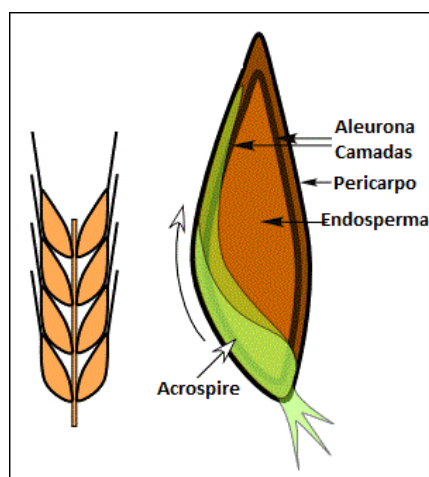
A produção de cevada não consegue satisfazer as exigências do consumo nacional e tem vindo a piorar, passando de um grau de auto-aprovisionamento de 22%, em 2008, para 6%, em 2011, com uma produção total de 21 000 ton (IACA, 2012).

No que diz respeito aos preços, em 2011, o valor médio da cevada foi de 225,70 €/ton, sendo ligeiramente mais baixo do que o registado para o milho (245,50 €/ton) ou mesmo para o trigo (241,30 €/ton) (IACA, 2012).

3.1.2. Estrutura do grão de cevada

O grão de cevada é constituído por pericarpo (ou casca), aleurona e endosperma (Figura 20). Estas três camadas contêm β -glucanos que aumentam a viscosidade do conteúdo digestivo e dificultam a digestão por parte de animais monogástricos (Bedford, 1996).

Figura 20 – Representação de um grão de cevada



Adaptado de <http://www.howtobrew.com/section2/chapter12.html>

A camada mais exterior é a casca, rica em fibra e que protege o grão de agressões mecânicas e da invasão por microrganismos patogênicos. Por baixo da casca encontra-se a aleurona (farelo), que contém fibra e proteína. No centro está o endosperma, que é constituído principalmente por amido, que fornece a maior parte da energia ao processo de germinação da semente e aos animais quando o cereal é utilizado na sua alimentação (Cheeke, 1991). O endosperma constitui a maior parte do grão (Nahas & Lefrançois, 2001).

3.1.3. Composição nutricional

A cevada é constituída principalmente por amido (cerca de 40 a 60% do grão) sendo o segundo maior constituinte a água (12% do grão) (McDonald *et al.*, 2002). Em quantidades mais pequenas, encontram-se também proteína, celulose, matérias não azotadas, lípidos, cinzas e outras substâncias (Lesson & Summers, 2001).

O valor nutricional da cevada é variável com o tipo e variedade e com as condições edafo-climáticas em que o cereal cresce (Classen *et al.*, 1985; Jeroch e Dänicke, 1996). Como se pode observar na Tabela 2 a composição deste cereal é bastante variável, com a energia metabolizável a variar entre 3081 e 3563 Kcal EM/kg alimento (3152.77 Kcal/Kg MS) e a proteína bruta entre os 66 e os 153 g/kg alimento (60 a 160 g/kg MS), para só citar alguns componentes.

Tal como acontece noutros cereais, a proteína é de baixa qualidade para alimentação animal, sendo particularmente deficitária em lisina (McDonald *et al.*, 2002). No entanto, quando comparada com o milho, tem um teor de proteína superior e de melhor qualidade (Cheeke, 1991). O conteúdo de lípidos é baixo, normalmente inferior a 25 g/Kg MS. Os

minerais e vitaminas estão normalmente presentes nos grãos de cevada num teor de 2,6% (McDonald *et al.*, 2002).

Tabela 2 – Composição Nutricional de 179 amostras de cevada

Cevada		
	Variação	Média
Energia Metabolizável (Kcal/kg)	3081,11 – 3562,89	3367.73
Proteína Bruta (g/kg)	66 - 153	108
Fibra Bruta (g/kg)	38 - 73	56
Gordura Bruta (g/kg)	11 - 32	19
Cinza (g/kg)	17 - 42	25
Macro-minerais (g/kg)		
Cálcio (Ca)	0,5 - 1,6	0,8
Magnésio (Mg)	0,9 - 1,6	1,2
Potássio (K)	3,5 - 6,3	4,9
Sódio (Na)	0,06 - 0,4	0,2
Fósforo (P)	2,6 - 5,2	3,8
Cloro (Cl)	0,8 - 2,2	1,4

Adaptado de McDonald *et al.* (2002)

3.1.1. Efeito dos PNA da cevada na alimentação de frangos

A cevada é um cereal que possui um alto teor de PNA solúveis (Choct, 2006). A utilização de cevada em altas concentrações, nas dietas para frangos, pode causar problemas graves devido ao aumento da viscosidade dos conteúdos digestivos que decorre da solubilização destes hidratos de carbono complexos, nomeadamente de β -glucanos (Brenes, Guener, & Marquardt, 1993). Os β -glucanos, devido aos seus efeitos, provocam uma redução no ganho médio diário dos animais e também aumentam a incidência de fezes molhadas e pegajosas, que podem causar problemas nas patas e prejudicar a qualidade do peito dos animais (Chesson, 1991). No entanto, as concentrações de β -glucanos, na cevada, variam com a cultivar, as condições edafo-climáticas de crescimento, a origem geográfica, estado de maturação na colheita e as condições de armazenamento da mesma (Aastrup, 1979) e, o valor nutritivo deste cereal varia com o teor de β -glucanos.

Para além dos PNA solúveis a cevada contém também grandes quantidades de celulose (Knudsen, 1997). Estas grandes quantidades de celulose, nas dietas dos frangos, diluem a energia metabolizável e causa um aumento do índice de conversão (Carré *et al.*, 1990).

4. Suplementação enzimática

4.1. Enquadramento histórico e função

As enzimas são produzidas por todos os organismos vivos e, como catalisadores da natureza, aceleram as reações químicas que permitem a vida, desde aos mais simples organismos unicelulares, passando por plantas e insetos até aos humanos. Sem elas o alimento não pode ser digerido (Bedford, 2000).

O uso de enzimas pelo Homem tem sido verificado ao longo da história da Humanidade e, como exemplos disso, temos o fabrico de queijos, fabrico de detergentes, clarificação de vinhos, produção de bebidas alcoólicas e na indústria da panificação (Uhlig, 1998; Campos, 2005). Mais recentemente, começou-se a recorrer às enzimas para a suplementação das dietas para animais, com o objetivo de melhorar o valor nutritivo dos diferentes matérias-primas, melhorar o valor nutricional do produto final e corresponder às exigências do consumidor por um produto mais barato, seguro, saudável e mais amigo do ambiente (Bedford, 2000; Grunert, 2005).

Atualmente, pode-se resumir a aplicação de enzimas na alimentação animal à avicultura e suinicultura. A suplementação das dietas com enzimas tem como objetivo de facilitar a libertação de fósforo, a eliminação do efeito de encapsulação dos nutrientes pelas paredes celulares, a solubilização e eliminação dos efeitos anti-nutritivos dos polissacáridos não amiláceos das paredes celulares e a hidrólise de ligações proteína-hidrato de carbono (Slominski, 2011).

4.2. Utilização de enzimas na alimentação animal

Os animais, apesar de produzirem quantidades adequadas de enzimas para a digestão de proteínas, hidratos de carbono e lípidos, carecem de determinadas enzimas como por exemplo as necessárias à degradação dos glúcidos complexos da parede celular vegetal. Os animais que conseguem fazer a digestão destes compostos, como é o caso dos herbívoros, fazem-no à custa de uma flora microbiana que se desenvolve abundantemente nos seus TGI e que possuem a maquinaria enzimática para a sua degradação. Isto é, a digestão dos compostos celulósicos nos animais depende sempre de uma digestão prévia

por enzimas microbianas. Para animais não-ruminantes é a adição de celulases e hemicelulases que permite a digestão destes compostos (Cheeke, 1991).

As celulases e hemicelulases microbianas são extensivamente usadas para suplementar dietas para frangos ricas em PNAs (Bedford, 2000; Fontes *et al.*, 2004). No entanto, um grande número de enzimas são necessárias para realizar a hidrólise completa das paredes celulares vegetais com concomitante diminuição do efeito anti-nutritivo associado com a ingestão de PNA solúveis (Fontes *et al.*, 2004). Os PNA solúveis, quando misturados com água, criam soluções viscosas por agregação dos seus polímeros constituintes, em grandes redes. Para destruir esta rede, não é necessário digerir completamente os polímeros envolvidos nos seus monossacáridos constituintes, mas simplesmente cindir os polímeros em fragmentos mais curtos de modo a que não fiquem associados em grandes grupos, i.e. não formem redes capazes de reter água e outros compostos (Bedford, 1995).

4.2.1. Celulases e Hemicelulases

As celulases e hemicelulases são glicosil-hidrolases, muito abundantes na natureza que catalizam a hidrólise de oligossacáridos e de polissacáridos das paredes celulares vegetais, bacterianas e de fungos e que são sintetizadas por microrganismos e por plantas (Gilbert & Hazlewood, 1993; Tomme, Warren & Gilkes, 1995).

A degradação de polissacáridos da parede celular inicia-se pela quebra das ligações glicosídicas, que conduz a uma diminuição do grau de polimerização destes hidratos de carbono. Contudo a complexidade química e física das paredes celulares vegetais restringe o acesso e o ataque das próprias enzimas que os degradam. Unicamente um numero restrito de microrganismos tem a capacidade de desconstruir estes hidratos de carbono estruturais (Fontes & Gilbert, 2010). Os sistemas enzimáticos de degradação das paredes celulares vegetais produzidos pelos microrganismos aeróbicos e anaeróbicos diferem consideravelmente na sua organização macromolecular e na eficiência dos seus processos (Warren, 1996). Os microrganismos aeróbicos produzem enzimas que são segregadas individualmente para o meio extracelular. A maioria destas enzimas são modulares, com um ou mais módulos catalíticos, ligados a domínios não catalíticos, de entre os quais se destacam os denominados Módulos de ligação aos Carbohidratos, CBMs que ligam as respetivas enzimas aos seus substratos alvo (Warren, 1996). Os microrganismos anaeróbicos produzem sistemas complexos de enzimas degradadoras das paredes celulares vegetais que se organizam em complexos multi-enzimáticos. Os ambientes anaeróbicos impõem inúmeras restrições energéticas, levando a uma pressão de seleção

efetiva que levou à formação destas nanomáquinas de alta eficiência, degradadoras das paredes celulares (Fontes & Gilbert, 2010).

4.2.2. Efeito das enzimas na alimentação animal

As dietas à base de cevada são frequentemente suplementadas com complexos enzimáticos, que contêm celulasas e hemicelulasas, em especial as β -glucanases, enzimas estas que estão implicadas na degradação dos β -glucanos presentes abundantemente neste cereal, e deste modo, permitem ultrapassar os efeitos anti-nutricionais dos mesmos (Hesselman & Åman, 1986). A suplementação de dietas de frangos com β -glucanases exógenas diminui a viscosidade do conteúdo intestinal e melhora o ganho de peso, a eficiência do Índice de conversão alimentar e a digestibilidade dos nutrientes (Brenes *et al.*, 1993; Philip, Gilbert & Smithart, 1995). Contudo os efeitos benéficos da adição de β -glucanases pode ser altamente afetada pelo conteúdo e solubilidade dos β -glucanos que, por sua vez, depende da variedade da cevada usada (Rotter, Neskar, Guenter & Marquardt, 1989; Nahas & Lefrançois, 2001), tratamento térmico (Viveros *et al.*, 1994; Vranjes & Wenk, 1995) e método de preservação (Svihus, Selmer-Olsen & Bâthen, 1995; Perttilä *et al.*, 2001). Por outro lado, o recurso à inclusão de enzimas conduz a maiores benefícios em frangos jovens (Bedford, 1995; Olukosi, Cowieson & Adeola, 2007).

4.2.2.1. Efeito da variabilidade dos lotes de cevadas na suplementação enzimática

Nos últimos anos, muitos estudos têm concluído que existem muitos fatores que podem modular uma resposta diferente da suplementação enzimática em dietas à base de cevada para aves. Estes fatores incluem o genótipo e as condições de crescimento dos cereais, o tempo de armazenamento após a colheita, a cultivar do grão, a estação do ano em que ocorreu o seu crescimento e o tipo de solo, entre outros (Villamide, Fuente, Perez de Ayala & Flores, 1997). Por outro lado, sabe-se que as diferenças nos níveis de PNA entre os diferentes lotes de cereais resultam em cereais com diferentes expressões de valores nutritivos. Existem provas concludentes que indicam que a energia dos grãos de cevada disponíveis para frangos é inversamente proporcional ao conteúdo de PNA solúveis (Villamide *et al.*, 1997). No entanto, como se refere em baixo, existem outros fatores que podem explicar a resposta imprevisível à suplementação enzimática, como sejam os níveis de atividades das celulasas e hemicelulasas endógenas do grão.

Resultados publicados por Ribeiro *et al.* (2011a) sugerem que os níveis de β -glucanases endógenas, que podem estar presentes em quantidades moderadas na cevada, mantendo-se ativas ao longo do trato gastrointestinal, podem contribuir para reduzir a viscosidade da digesta e consequentemente a eficácia de celulases exógenas usadas para suplementar dietas para frangos. Além disso, estes autores também revelaram que os níveis de β -glucanases endógenas variam largamente entre diferentes lotes de cevada. Esta variação pode ser mais pronunciada do que a variação entre os níveis de β -glucanos. Portanto, a variabilidade da resposta à suplementação enzimática pode resultar, entre outros fatores, da variabilidade de níveis de atividade β -glucanásica presente nos grãos de cevada (Ribeiro *et al.*, 20011a).

4.2.2.2. Efeito da suplementação diferencial ao longo do tempo

Alguns estudos revelam que o efeito da adição enzimática é mais favorável nas primeiras etapas de crescimento dos frangos, mas outros demonstram que é nas últimas etapas de crescimentos. No caso do trigo, Fontes *et al.* (2004) sugerem que os efeitos da suplementação com enzimas são mais relevantes nos últimos estágios de crescimento. Por outro lado, Rotter *et al.* (1989) e Nahas e Lefrançois (2001) afirmam, que em dietas à base de cevada, dá-se um aumento na resposta à suplementação com β -glucanases, nos primeiros tempos de vida.

Existem razões lógicas para explicar o porquê da suplementação poder ser benéfica tanto para aves jovens como mais velhas. Nas aves jovens, a produção de enzimas digestivas endógenas é baixa e pode limitar a digestão do alimento (Nitsan *et al.*, 1991; Dunnington & Siegel, 1995). Uma resposta mais tardia pode dever-se à interação entre a viscosidade e os conteúdos digestivos (Bedford & Morgan, 1996).

O sistema digestivo dos frangos jovens é relativamente pouco desenvolvido e a produção de enzimas endógenas nos primeiros tempos de vida é reduzida. A inexistência de quantidades suficientes de enzimas pode impossibilitar a correta digestão e utilização do alimento (Lindeman *et al.*, 1986; Nitsan, Benavraham, Zoref & Nir, 1991; Dunnington & Siegel, 1995; Kirjavainen & Gibson, 1999). Assim sendo, a adição de enzimas exógenas pode melhorar a capacidade digestiva de aves por complementaridade do repertório de enzimas intestinais existentes, contribuindo para aumentar a capacidade digestiva dos animais.

Mas, tal como a idade das aves, as capacidades digestivas e as capacidades da microflora aumentam, sendo que o papel da microflora e os efeitos das enzimas exógenas podem tornar-se mais importantes, com o aumento da idade dos animais (Bedford, 2000).

Isto pode resultar de um aumento da eficiência da fermentação microbiana no ceco ou através de mudanças nas populações microbianas cecais com efeito na capacidade digestiva global deste órgão (Apajalahti & Bedford, 1999).

Portanto, neste ensaio irá ser avaliado o impacto da suplementação enzimática durante todo o ciclo de vida dos animais em contraposição com a suplementação em apenas algumas partes do seu ciclo de produção.

5. Objetivo

Este trabalho propõe-se esclarecer algumas questões relativas à suplementação multi-enzimática em dietas à base de cevada, para frangos de carne, nomeadamente:

- Saber em que altura do ciclo produtivo dos frangos é mais eficiente a suplementação enzimática;
- Confirmar se utilização do suplemento enzimático é eficaz quando adicionado a dietas à base de cevada com baixas atividades β -glucanásicas e altas viscosidades;
- Inferir a importância económica da suplementação enzimática num momento restrito do ciclo produtivo.

Capítulo III – Material e Métodos

1. Procedimentos Laboratoriais

1.1. Análise da cevada

Antes do ensaio, foram recolhidas amostras de cevada de diferentes origens e analisadas em laboratório, de modo a selecionar a cevada que tivesse os valores mais baixos de atividade β -glucanásica, por forma a melhor responder à suplementação enzimática. Depois de analisadas as várias cevadas e de selecionada a pretendida, procedeu-se à elaboração do alimento composto.

1.1.1. Atividade enzimática endógena da cevada

A atividade β -glucanásica da cevada foi avaliada segundo o método descrito por Fontes *et al.* (2000) e recorrendo a um kit comercial de Azo Barley Glucan (Megazyme International, Ireland). Este procedimento consiste numa análise espectrofotométrica que permite contabilizar os açúcares simples libertados pela atividade enzimática endógena da cevada. Para tal, pesa-se 0,75g de cevada, previamente moída, e adiciona-se 1 mL de tampão 50mM fosfato-citrato pH 6,5 (Tampão PC – Anexo 2). Coloca-se em agitação durante 30 min, a 37 °C e depois centrifuga-se durante 5 minutos, a 16000x g. Recolhe-se o sobrenadante total. Para um novo eppendorf pipeta-se 150 μ L do sobrenadante obtido e adiciona-se 150 μ L de Azo-Barley Glucan. Depois a reação sofre uma incubação a 40 °C durante 3 horas. Decorrido este período, adiciona-se a solução precipitante (Solução A – Anexo 2) que conduz ao término da reação e centrifuga-se, durante 10 minutos a 1000xg. Por fim, mede-se a absorvância a 590 nm em relação a um ensaio em branco desprovido de enzima. As análises foram efetuadas sempre em duplicado.

1.1.2. Viscosidade das amostras de cevada

A viscosidade é uma propriedade que descreve a resistência de um fluido ao escoamento. Os fluidos resistem tanto aos objetos que se movem neles, como também ao movimento de diferentes camadas do próprio fluido. A análise da viscosidade de amostras de cereais é realizada porque muitos estudos sugerem que os β -glucanos endógenos formam um gel de alta viscosidade com propriedades específicas, que podem afetar negativamente a digestibilidade dos mesmos (Ribeiro *et al.*, 2011a, 2011b).

Para a análise desta viscosidade, pesaram-se, em duplicado, 15 g de cereal previamente moído, com granulometria de 1 mm. Foram adicionados 15 mL de tampão 50 mM fosfato-citrato pH 6,5 (Tampão PC), a que se seguiu uma agitação vigorosa durante 5 minutos e

uma centrifugação a 7500x g durante 10 minutos. A partir do sobrenadante obtido, pipetaram-se 0,90mL para o copo do viscosímetro e mediu-se a viscosidade com o viscosímetro Brookfield (Modelo LVDVCP-II, Brookfield Engineering Laboratories), a uma temperatura constante de 24 °C.

1.2. Análise do alimento concentrado

O alimento concentrado foi analisado relativamente à Matéria Seca (MS), Proteína Bruta (PB), Gordura Bruta (GB), Fibra neutro detergente (NDF), Fibra ácido detergente (ADF) e Lenhina ácido detergente (ADL). As análises foram realizadas de acordo com os métodos especificados pela Association of Official Analytical Chemists (1980).

1.3. Análise dos conteúdos intestinais

1.3.1. Atividade enzimática dos conteúdos intestinais

A deteção da atividade beta-glucanásica das amostras de conteúdo digestivo foi realizada seguindo o procedimento descrito por Fontes *et al.* (2000). As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos à velocidade máxima (16000 x g) e os sobrenadantes foram recolhidos para análise. A análise qualitativa da atividade enzimática dos conteúdos gastrointestinais foi realizada em placas de agár, usando 0,1 % (p/v) de β -glucano (Barley Beta Glucan, Megazyme), em 10 mM de Tris-HCl pH 8 (com agar a 2 % p/v)). A atividade foi detetada após 36h de incubação a 37 °C, utilizando o corante Vermelho do Congo numa concentração final de 1 % (p/v) em 10mM de Tris-HCl pH 8. Após a incubação com corante, durante 30 minutos, procedeu-se a lavagens sucessivas com uma solução descorante de NaCl a 1M, com intervalos de 15 minutos entre lavagens, até o excesso de corante estar removido e serem relevados os halos da atividade beta-glucanásica.

1.3.2. Viscosidade dos conteúdos intestinais

A viscosidade intestinal foi determinada imediatamente após o abate das aves. Isto porque a viscosidade dos conteúdos intestinais é sensível a vários fatores ambientais, e portanto, quanto maior o tempo de espera, maior será a viscosidade.

A avaliação da viscosidade dos conteúdos intestinais foi feita no Laboratório Professor Pais de Azevedo, do Instituto Superior de Agronomia, logo após o abate dos animais. Para esta avaliação, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 7500 x g. A partir do sobrenadante, pipetou-se 0,90mL para o copo do viscosímetro e, foi então medida a

viscosidade com o viscosímetro Brookfield (Modelo LVDVCP-II, Brookfield Engineering Laboratories).

2. Animais e Maneio

Tendo como base o trabalho desenvolvido por Ferreira (2009), procedeu-se à realização de um ensaio, para o estudo do efeito da suplementação enzimática na performance de frangos de carne, alimentados com dietas à base de cevada, durante um período de 35 dias. O ensaio foi conduzido em concordância com as regras legais de experimentação animal da Faculdade de Medicina Veterinária e, aprovadas pelo Comité de Cuidados Animais da Autoridade Nacional de Veterinária (Direção Geral de Veterinária, Lisboa, Portugal), seguindo a legislação da União Europeia (Council Directive 86/609/EEC) e procedimentos recomendados de produção (ROSS, 2009; ROSS, 2012).

2.1. Preparação do alimento composto

O alimento utilizado no ensaio à base de cevada foi fabricado na secção de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia (ISA-UTL), para satisfazer as necessidades dos frangos em crescimentos, tal como preconizado pelo National Research Council (1994) e encontra-se descrita no Tabela 3 e 4.

Tabela 3 - Composição e nível estimado de nutrientes do alimento concentrado base

Ingrediente	Incorporação (kg/por 100 kg)
Cevada	61.8
Bagaço de Soja 47%	29.4
Óleo de Soja	5.9
Sal	0.25
Carbonato de Cálcio	0.84
Fosfato dicálcico 18%	1.74
DL-Metionina	0.17
Premix¹	0.25
Nível Estimado de Nutrientes	
Energia (kcal EM/kg)	2890,0
Proteína Bruta (%)	20,8
Gordura Bruta (%)	7,5
Fibra Bruta (%)	5,1

Tabela 4 - Composição química obtida do alimento concentrado base

Composição química obtida	
Energia (kcal EM/kg MS)	2819,65
Matéria Seca (%)	87,89
Proteína Bruta (%)	19,33
Gordura Bruta (%)	6,63
Cinza (%)	11,01
NDF (%)	17,67
ADF (%)	5,34
ADL (%)	1,39

1 Pre-mistura de vitaminas e minerais. Fornece por kg de alimento: vitamina A, 9000 IU; vitamina D3, 2100 IU; vitamina E, 20 mg; ácido nicotínico, 30 mg; vitamina B12, 0,12 mg; ácido pantoténico, 10 mg; vitamina K3, 2 mg; tiamina, 1 mg; riboflavina, 4,2 mg; vitamina B6, 1,7 mg; ácido fólico, 0,5 mg; biotina, 0,5 mg; Fe, 80 mg; Cu, 10 mg; Mn, 100mg; Zn, 80 mg; Co, 0,2 mg; I, 1,0 mg; Se, 0,3 mg; monensina, 100 ppm.

As matérias-primas utilizadas foram moídas num moinho de martelos, misturadas durante 7 minutos e o alimento composto resultante foi posteriormente granulado mecanicamente e armazenado em caixas.

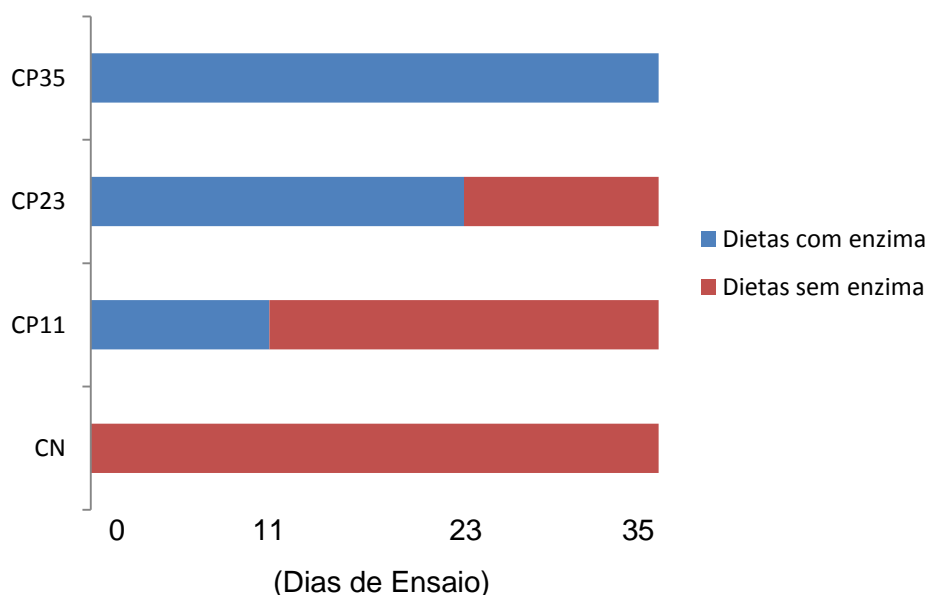
2.2. Tratamentos

Os animais foram divididos em 4 grupos correspondentes a 4 dietas. As diferentes dietas utilizadas foram compostas pelo mesmo alimento base. Os animais foram alimentados por uma dieta à base de cevada não suplementada com enzima (controlo negativo) ou pela mesma dieta suplementada com enzima (Rovabio®) durante 11 dias (CP11), durante 23 dias (CP23) ou durante todo o ensaio experimental (CP35), como é possível observar na Figura 21. A taxa de incorporação foi a recomendada pelo fabricante e encontra-se descrita no Tabela 5.

Tabela 5 – Tratamentos em estudo

Tratamento		Incorporação
CN	Controlo Negativo	-
CP11	Suplementado apenas do dia 1 ao dia 11	50g/ton
CP23	Suplementado apenas do dia 1 ao dia 23	50g/ton
CP35	Suplementado durante todo o ensaio	50g/ton

Figura 21 – Esquema representativo da forma de administração da dieta controle (sem suplementação enzimática comercial) e dos grupos teste (com suplementação enzimática comercial durante os vários períodos de tempo)



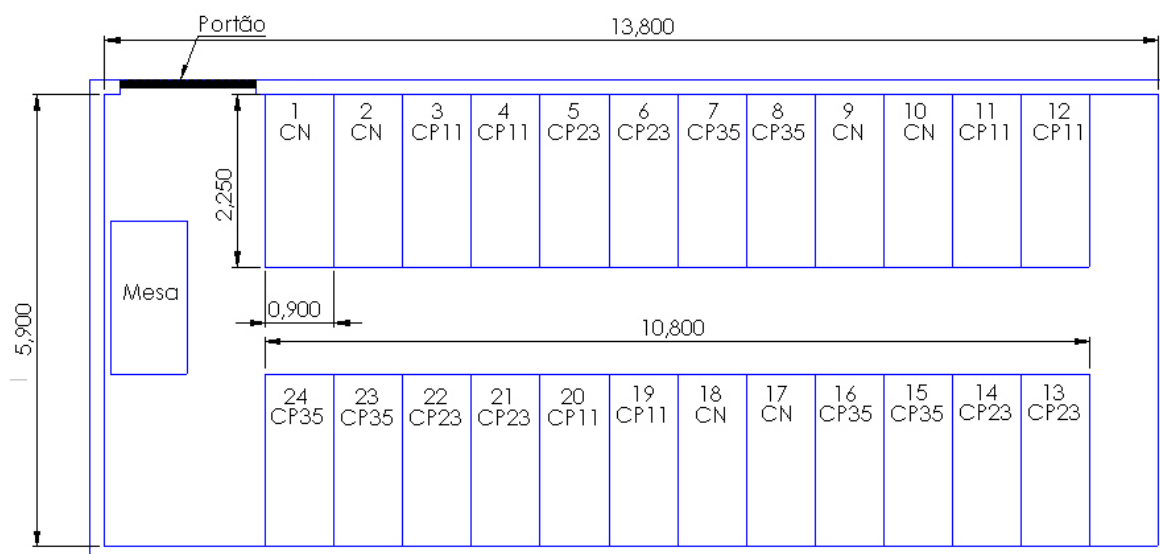
2.2.1. Animais

Para este ensaio foram adquiridos 600 pintos machos com um dia de idade e da estirpe Ross 308.

No início do ensaio os animais foram identificados na asa com uma anilha numerada, pesados individualmente e distribuídos aleatoriamente em grupos de 25, pelas 24 gaiolas e mantidos sob as mesmas condições ambientais. Os animais foram distribuídos por 4 tratamentos diferentes descritos por CN, CP11, CP23 e CP35. A unidade experimental foi de 6 réplicas por tratamento, totalizando 150 aves por tratamento, conforme esquematizado na Figura 22.

Cada grupo de animais tinha à sua disposição água e alimento *ad libitum*. Diariamente foi adicionado alimento aos comedouros e verificado o bom funcionamento das pipetas, da ventilação e da temperatura.

Figura 22 – Representação da sala e distribuição dos tratamentos por gaiolas



2.2.2. Instalações

O ensaio decorreu na secção de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia, numa sala de 81,42 m² (13,80 m de comprimento x 5,90 m de largura) com temperatura e ventilação controladas (Figura 23).

As gaiolas estão dispostas em duas fileiras, no chão com aparas de madeira. Cada gaiola dispõe de uma área de 2,025 m² (0,081 m²/ave), um comedouro circular e dois a três bebedouros de pipeta. Foram utilizadas lâmpadas de aquecimento de infravermelhos de 150 watt de potência (Philips Electronics®), por cada gaiola, durante todo o ensaio, tendo sido aumentada a distância ao chão consoante o crescimento e as necessidades de calor dos animais.

A altura dos bebedouros e comedouros foi regulada diariamente de acordo com o manual de manejo (ROSS, 2009) e o desenvolvimento dos animais.

Antes da entrada dos animais, a sala foi sujeita a um vazio sanitário durante 8 dias, após a lavagem com um detergente de superfícies Detersan® (Sogeval, França) e um desinfetante com uma solução comercial de formaldeído 0.5% (Limoseptic®, Univete SA., Portugal), de acordo com indicações do fabricante. A sala foi previamente aquecida de modo a que a temperatura das gaiolas fosse de 30 °C e a do ambiente de cerca de 28 °C, sendo depois progressivamente reduzida e controlada conforme as necessidades dos animais, assim como a ventilação da sala.

Figura 23 – Aspeto da sala usada para a realização do Ensaio



2.2.3. Registos

Os pesos individuais dos animais foram registados semanalmente, bem como os refugos de alimento existentes nos comedouros. No entanto, como as pesagens não coincidiram com os períodos de suplementação, procederam-se também a pesagens nos dias de transição do alimento (i.e., mudança da dieta com enzima para a dieta sem enzima). O alimento adicionado foi registado diariamente, assim como a mortalidade. As condições da sala e o estado dos animais foram verificadas e registadas duas vezes por dia.

2.2.4. Abates

No final do ensaio foram abatidos 2 animais por gaiola (48 animais) por deslocamento cervical após insensibilização e procedeu-se ao registo das dimensões dos órgãos do TGI (papo, moela, fígado, duodeno, jejuno, íleo e cecos), recolha de amostras dos conteúdos gastrointestinais para análise enzimática e para medição da viscosidade.

3. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada recorrendo a análises de variância (ANOVA), utilizando o procedimento “General Linear Models” do programa SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Os resultados do ensaio foram analisados e a unidade experimental considerada foi a gaiola de 25 animais ($n=6$). As diferenças entre cada um dos parâmetros utilizados foram testadas com o teste de Duncan e foram consideradas significativas quando $P<0,05$.

Capítulo IV – Resultados e Discussão

1. Determinação da atividade endógena da cevada

1.1. Introdução

Os níveis de β -glucanases endógenas da cevada podem variar muito entre lotes (Villamide *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2011a), representando por vezes uma variação mais pronunciada do que os níveis de próprios β -glucanos. Como se referiu atrás, a variabilidade da resposta à suplementação enzimática de uma dieta à base de cevada pode ser influenciada, entre outros fatores, pela variabilidade dos níveis de atividade β -glucanásica presente nos grãos da cevada e não só pelos níveis de β -glucano. Assim, conforme referido por Ribeiro *et al.* (2011a) e Serrano (2012), as β -glucanases endógenas podem estar presentes em moderadas quantidades na cevada e podem atuar no trato GI, contribuindo para reduzir a viscosidade da digesta e, conseqüentemente, diminuir a eficácia das celulases exógenas usadas para suplementar dietas para frangos de carne.

Assim sabendo-se que uma maior atividade enzimática endógena da cevada é favorável para o desempenho produtivo das aves, a seleção de uma cevada com baixa atividade β -glucanásica endógena e alta viscosidade é um passo essencial para uma primeira avaliação do complexo enzimático que nos propomos estudar, pois só nestas condições será, aparentemente, vantajoso adicionar enzimas.

1.2. Resultados

Na Tabela 6 estão indicados os resultados da atividade β -glucanásica endógena e a viscosidade de 12 lotes de cevada, como fase prévia para o ensaio experimental e, analisados como descrito no Material e Métodos 1.1.1 e 1.1.2, respetivamente.

Para este ensaio, a cevada selecionada foi a B68, porque foi a que apresentou menor atividade enzimática β -glucanásica endógena e maior viscosidade.

Tabela 6 - Atividade enzimática endógena e viscosidade dos vários lotes de cevada recolhidos e analisados para o ensaio.

ID	Act. Enzim. Endógena (Abs)	Abs corrigida	U/kg	Viscosidades
B48	0,762	0,672	427,05	14,75
B49	0,889	0,799	507,06	12,25
B50	2,016	1,926	1217,38	9,70
B52	0,744	0,504	321,21	12,80
B53	1,372	1,132	717,16	16,05
B54	0,849	0,609	387,67	15,00
B55	0,921	0,681	433,03	19,45
B57	1,915	1,831	1157,22	5,85
B58	0,862	0,772	490,36	12,50
B65	2,070	1,929	1219,27	9,78
B67	1,850	1,709	1080,67	7,64
B68	0,544	0,403	257,58	50,00

ID-Identificação de Lote

1.3. Discussão

A seleção prévia de uma cevada que melhor cumpra os nossos requisitos é um dos passos mais importantes para não comprometer os resultados da suplementação enzimática. Mais uma vez se pôde verificar que existe uma grande variabilidade entre lotes, o que está de acordo com os trabalhos realizados por Ribeiro *et al.* (2011a) e Serrano (2012).

Para o nosso ensaio, a cevada escolhida foi a que apresentou a menor atividade endógena e a maior viscosidade de todas as testadas (B68) e, desta forma, espera-se que com a adição do complexo enzimático, haja uma diminuição da viscosidade dos conteúdos digestivos, devido à ação das enzimas adicionadas ao regime alimentar, constituído à base de cevada para frangos de carne. Por outro lado, espera-se que os regimes não suplementados mantenham a tendência original de baixa atividade β -glucanásica e alta viscosidade.

2. Efeito da suplementação multi-enzimática em dietas à base de cevada, em diferentes alturas do seu crescimento

2.1. Introdução

A cevada (género *Hordeum*) apresenta um elevado teor de proteína (comparativamente a outros cereais) e de melhor qualidade (Cheeke, 1991) e, por vezes com menores custos do que o milho, o que a torna um cereal com potencial para ser fornecido a frangos de carne. Contudo, o nível de polissacáridos não amiláceos (PNA) presentes nos grãos de cevada é consideravelmente elevado, especialmente β -glucanos, quando comparado com o milho (Brenes *et al.*, 1993) conduzindo a um aumento da viscosidade dos conteúdos gastrointestinais e diminuição da digestibilidade dos nutrientes. De modo a tentar contornar estes efeitos, a suplementação de dietas com enzimas exógenas, que degradam os polissacáridos das paredes celulares, e originam produtos simples facilmente aproveitados pelos animais, conduzem a um efeito positivo na digestibilidade da cevada e consequentemente na performance dos animais (Fontes & Gilbert, 2010; Hesselman & Åman, 1986; Brenes *et al.*, 1993; Philip *et al.*, 1995).

2.2. Resultados

Para avaliar o efeito da suplementação enzimática exógena na performance de frangos de carne, foram utilizados 3 tratamentos com suplementação em diferentes idades dos animais e 1 tratamento sem suplementação enzimática. Antes de se iniciar este ensaio, foi efetuado um estudo para avaliar a qualidade e atividade endógena da cevada que iria ser utilizada.

2.2.1. Desempenho produtivo dos animais

A mortalidade durante todo o ensaio experimental foi baixa (1,33%) e não foi relacionada com os tratamentos. O peso corporal dos animais, ganho de peso, ingestão de alimento e índice de conversão são apresentados nas Tabela 7 e 8.

Tabela 7 – Resultados da performance dos animais (acumulado semanalmente) alimentados com uma dieta à base de cevada, não suplementadas (CN) ou suplementadas com um complexo enzimático comercial durante os primeiros 11 dias (CP11), os primeiros 23 dias (CP23) ou durante todo o ensaio experimental (CP35)

	Tratamentos				EPM	p(F)
	CN	CP11	CP23	CP35		
Pesos (g)						
P0	46.7	47.4	47.2	47.0	0.411	0.6656
P7	141	142	139	139	2.382	0.6656
P14	379 ^c	385 ^b	402 ^a	393 ^{ab}	3.647	0.0011
P21	724 ^b	766 ^a	785 ^a	769 ^a	9.639	0.0016
P28	1249 ^b	1327 ^a	1345 ^a	1313 ^a	15.434	0.0017
P35	1930 ^b	2010 ^a	2016 ^a	2006 ^a	26.896	0.1094
Ganhos de Peso (g)						
G0-7	93,85	94,33	91,69	91,43	1.208	0.2452
G7-14	231 ^a	244 ^b	262 ^c	253 ^{bc}	3.420	<.0001
G14-21	411 ^a	381 ^b	416 ^a	404 ^a	7.470	0.0164
G21-28	512	543	529	530	12.293	0.3822
G28-35	677	675	688	680	14.125	0.9198
G0-35	1883 ^b	1962 ^a	1968 ^a	1959 ^a	28.188	0.1748
Ingestão (g)						
Ing0-7	123 ^b	133 ^{ab}	138 ^a	129 ^b	2.196	0.0011
Ing7-14	340 ^b	363 ^a	365 ^a	360 ^a	4.852	0.0057
Ing14-21	656	685	670	686	15.478	0.4960
Ing21-28	931	963	935	932	21.019	0.6607
Ing28-35	122	128	129	122	37.942	0.3348
Ing0-35	3270	3431	3405	3322	69.725	0.3581
Índice de Conversão (Ingestão/Ganho de Peso)						
IC0-7	1,31 ^c	1,41 ^b	1,50 ^a	1,41 ^b	0.0243	0.0002
IC7-14	1,52 ^a	1,50 ^{ab}	1,44 ^b	1,46 ^b	0.0201	0.0507
IC14-21	1,83	1,80	1,71	1,80	0.0585	0.5229
IC21-28	1,59	1,59	1,50	1,52	0.0419	0.3379
IC28-35	1,84	1,96	1,98	1,83	0.0586	0.1850
IC0-35	1,78	1,81	1,78	1,74	0.0392	0.7059

¹ Erro padrão da Média

^{a,b,c} Os valores de uma linha que não partilhem o mesmo sobrescrito apresentam diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$)

Tabela 8 – Resultados da performance dos animais (na mudança de regime para a ausência de suplementação) alimentados com uma dieta à base de cevada, não suplementadas (CN) ou suplementada com um preparado enzimático comercial durante os primeiros 11 dias (CP11), os primeiros 23 dias (CP23) ou durante todo o ensaio experimental (CP35)

	Tratamentos				EPM	p(F)
	CN	CP11	CP23	CP35		
Pesos (g)						
P0	46,7	47,4	47,2	47,0	0,4115	0,6656
P11	266 ^b	275 ^a	277 ^a	274 ^a	23,825	0,0252
P23	860 ^b	908 ^a	923 ^a	986 ^a	86,877	0,0004
P35	1930 ^b	2010 ^a	2016 ^a	2006 ^a	268,961	0,1094
Ganhos de Peso (g)						
G0-11	220 ^b	228 ^a	230 ^a	226 ^a	23,542	0,0377
G11-23	594 ^b	633 ^a	646 ^a	712 ^a	72,201	0,0018
G23-35	1070	1102	1093	1020	26,506	0,6567
G0-35	1883 ^b	1962 ^a	1968 ^a	1959 ^a	28,188	0,1748
Ingestão (g)						
Ing0-11	287 ^b	313 ^a	320 ^a	305 ^a	33,819	0,0001
Ing11-23	1045	1086	1068	1082	18,828	0,4251
Ing23-35	1936	2028	2014	1935	53,907	0,4822
Ing0-35	3270	3431	3405	3322	69,725	0,3581
Índice de Conversão (Ingestão/Ganho de Peso)						
IC0-11	1,34 ^c	1,38 ^b	1,43 ^a	1,38 ^b	0,0144	0,0032
IC11-23	1,78	1,79	1,71	1,77	0,0443	0,2331
IC23-35	1,86	1,91	1,90	1,81	0,0508	0,4947
IC0-35	1,78	1,81	1,78	1,74	0,0392	0,7059

¹ Erro padrão da Média

^{a,b,c} Os valores de uma linha que não partilhem o mesmo sobrescrito apresentam diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$)

Os resultados mostram diferenças significativas de performance entre os frangos alimentados com dietas não suplementadas e os alimentados com as dietas suplementadas com uma mistura enzimática comercial até ao dia 11 do ensaio. Os animais dos grupos suplementados mostram pesos corporais mais altos ao dia 11 do ensaio, diferença essa que se manteve significativa ao longo de todo o ensaio experimental. Adicionalmente, não foram encontradas diferenças significativas entre os três tratamentos com diferentes períodos de suplementação (CP11, CP23 e CP35).

Os valores da ingestão de alimento foram semelhantes entre tratamentos, exceto nos primeiros 11 dias de ensaio, onde os frangos dos grupos suplementados mostraram maiores níveis de ingestão do que os animais do grupo controle. Estas diferenças na ingestão de alimento foram também refletidas no IC, que mostrou ser mais baixo no grupo controle, mais alto no grupo CP23 e intermédio nos restantes grupos, unicamente nos primeiros 11 dias do ensaio.

O peso relativo e comprimento dos diferentes compartimentos gastrointestinais, tal como os dados da viscosidade do conteúdo digestivo, estão presentes na Tabela 9.

Tabela 9 – Peso e comprimento relativo do trato gastrointestinal e viscosidades das amostras dos conteúdos digestivos dos animais alimentados com uma dieta à base de cevada, não suplementada (CN) ou suplementada com uma enzima comercial durante os primeiros 11 dias (CP11), os primeiros 23 dias (CP23) ou durante todo o ensaio experimental (CP35)

	Tratamentos				EPM	p(F)
	CN	CP11	CP23	CP35		
Pesos Relativos (g/kg PV)						
Papo	2,48	2,42	2,43	2,26	0,135	0,6723
Moela	12,7	13,2	12,8	12,9	0,672	0,9605
Fígado	24,1	23,1	24,2	24,5	0,937	0,7645
Duodeno	5,93	5,75	6,11	5,49	0,212	0,2200
Jejuno	12,60	12,50	12,30	12,00	0,419	0,7100
Íleo	10,6	10,40	11,00	9,7	0,431	0,2036
Cecos	2,21	2,14	2,19	1,89	0,121	0,2200
Comprimento Relativo (cm/kg PV)						
Duodeno	14,0	13,4	13,5	13,5	0,414	0,7297
Jejuno	34,3	35,0	32,7	34,4	10,19	0,4337
Íleo	36,4	36,0	35,4	35,2	11,31	0,8786
Cecos	9,1	9,1	9,0	8,8	0,340	0,8832
Viscosidades (cP)						
Duodeno+jejuno	5,84 ^a	5,30 ^a	5,13 ^a	2,56 ^b	0,579	0,0011
Íleo	10,8 ^a	12,6 ^a	9,04 ^b	4,82 ^c	1,133	0,0001

¹ Erro padrão da Média

^{a,b,c} Os valores de uma linha que não partilhem o mesmo sobrescrito apresentam diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$)

Não foram encontradas diferenças, no peso e comprimento dos compartimentos gastrointestinais, entre tratamentos. Contudo, os valores da viscosidade mostraram ser

afetados pelos diferentes tratamentos. A viscosidade do conteúdo digestivo do duodeno e jejuno foi menor quando a suplementação enzimática foi fornecida até ao fim do ensaio (tratamento CP35). Contudo, a viscosidade ileal diminuiu, quando comparado com os tratamentos CN e CP11, e esta diminuição foi mais marcada no dia 35, quando a viscosidade do íleo alcançou os menores valores.

2.2.2. Atividades enzimáticas

Para avaliar a presença e estabilidade, *in vivo*, das enzimas comerciais ao longo do trato gastrointestinal, procedeu-se à análise das atividades enzimáticas, dos conteúdos recolhidos de diversas porções do trato gastrointestinal das aves, após o abate dos animais, como descrito no Material e Métodos 1.3.1. As amostras foram recolhidas do papo, moela, duodeno, jejuno, íleo e ceco. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 10.

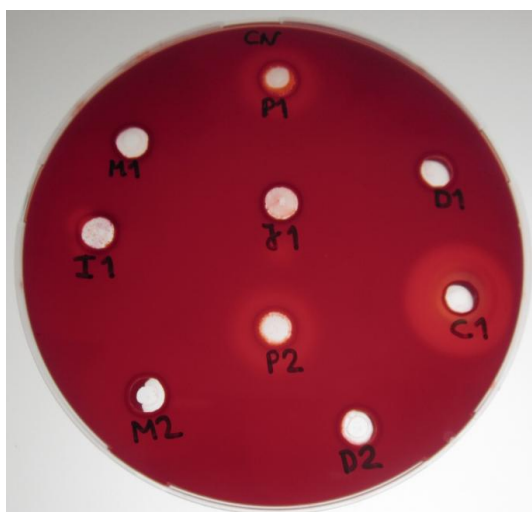
Tabela 10 – Detecção qualitativa da atividade β -glucanásica dos conteúdos digestivos colhidas dos compartimentos gastrointestinais de 48 frangos alimentados com uma dieta à base de cevada, não suplementada (CN) ou suplementada com uma enzima comercial durante os primeiros 11 dias (CP11), os primeiros 23 dias (CP23) ou durante todo o ensaio experimental (CP35)

	Tratamentos			
	CN	CP11	CP23	CP35
Papo	+/+/+/+/+	+/-/+/-/+	+/+/+/+/+	+/+/+/+/+
Moela	-/-/-/-/-	-/-/+/-/-	-/-/+/-/-	+/-/+/-/+
Duodeno	-/-/-/-/+	-/-/-/+/-	-/-/-/-/-	-/-/-/-/-
Jejuno	-/-/-/-/-	-/-/+/-/+	-/-/-/-/-	-/-/-/-/+
Íleo	-/+/-/+/-	-/+/-/-/-	-/+/-/+/-	-/-/-/-/+
Ceco	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+	+/+/+/+

Os símbolos indicam presença (+) ou ausência (-) de atividade beta-glucanásica. B-glucano em concentração de 0,1 % (p/v)

Pela observação dos resultados, verifica-se que os frangos alimentados com dietas não suplementadas (CN) e dietas suplementadas com uma enzima comercial, durante os primeiros 11 dias (CP11), os primeiros 23 dias (CP23) ou durante todo o ensaio experimental (CP35), demonstram atividades enzimáticas gastrointestinais muito semelhantes.

Figura 24 – Avaliação qualitativa, através do teste do vermelho do Congo, da atividade β -glucanásica de amostras recolhidas de animais alimentados com dietas à base de cevada do tratamento CN



Abreviaturas: P=Papo; M=Moela; D=Duodeno; J=Jejuno; I=Íleo; C=Ceco.

2.3. Discussão

A cevada em grão é muito utilizada nas dietas dos frangos, mas a sua constituição em polissacáridos não amiláceos (PNA), nomeadamente β -glucanos, pode limitar a utilização de grandes porções deste cereal na produção de frangos de carne. Para reduzir este efeito negativo dos polissacáridos anti-nutritivos da cevada, é comum adicionar-se misturas de enzimas, principalmente de origem microbiana, que são capazes de reduzir o seu grau de polimerização e, desta forma, aumentam a digestibilidade dos nutrientes, a ingestão de alimento e a taxa de crescimento. No entanto, poucos estudos esclarecem qual é a altura mais benéfica, do ciclo produtivo dos frangos, para esta suplementação sabendo-se, contudo, que no caso das dietas à base de cevada as respostas à suplementação são mais evidentes na primeira fase da vida produtiva. Assim, normalmente as enzimas exógenas são adicionada ao alimento durante todo o período produtivo o que, técnica e economicamente, pode não se justificar.

No presente estudo, avaliou-se o efeito da suplementação enzimática numa dieta à base de cevada, em diferentes períodos do crescimento dos frangos de carne. Este estudo surgiu em consequência de resultados experimentais anteriores, que sugerem que a resposta à suplementação enzimática, em dietas com altas incorporações de grãos de cereais, podem ocorrer nos primeiros tempos da vida dos frangos (Rotter, 1989; Salih, Classen & Campbell,

1991; Steenfeldt, Mullerts & Jensen, 1998; Nahas & Lefrançois, 2001; Palander, Näsi & Järvinen, 2005; Garcia, 2008) ou nos últimos, como é o caso do trigo (Fontes *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2012). Assim sendo, pretendeu-se averiguar qual a idade em que os animais respondem de forma mais relevante e benéfica, à suplementação enzimática, em dietas à base de cevada.

Verificou-se, então, que as aves alimentadas com dietas à base de cevada, suplementadas com uma mistura enzimática comercial, atingiram maiores pesos corporais e ganhos de peso do que as aves em que a dieta não se encontrava suplementada. Estes dados de performance foram consistentes com resultados anteriores, que referem que a suplementação enzimática, nomeadamente com β -glucanases, podem aumentar o valor nutritivo de dietas à base de cevada para frangos de carne (Brenes *et al.*, 1993; Philip *et al.*, 1995). A pior performance produtiva dos animais alimentados com dietas não suplementadas, comparativamente às suplementadas, pode dever-se também ao aumento da viscosidade dos conteúdos digestivos, à conjugação da diminuição da velocidade do trânsito gastrointestinal, que provocou uma diminuição da ingestão, com o efeito do encapsulamento dos nutrientes provocados pelos PNAs, e com a fraca capacidade digestiva dos animais. Estes resultados vão de encontro com os estudos de Antoniou e Marquardt, (1981) e Bedford (1993) que afirmam que as altas viscosidades na dieta reduzem o contacto entre os nutrientes e as enzimas que os irão degradar e, consequentemente assiste-se a uma redução na digestibilidade e absorção dos nutrientes levando a uma menor performance nas taxas de crescimento e no índice de conversão alimentar (IC). Além disso, a suplementação enzimática pode ter originado modificações na flora intestinal, que podem ter conduzido a um aumento da digestibilidade da fração lipídica e aumento da disponibilidade de hidratos de carbono, conduzindo a um aumento da energia metabolizável disponível da dieta (Marquardt, 1997). Isto porque, a suplementação enzimática reduz a viscosidade dos conteúdos digestivos e esta diminuição na viscosidade, com concomitante disponibilização de nutrientes específicos, pode favorecer a proliferação microbiana benéfica em prejuízo de uma microflora anormal, com possíveis benefícios para a saúde dos animais (Smits & Annison, 1996; Silva & Smithard, 2002; Józefiak *et al.*, 2007; Van der Klis *et al.*, 1993; Bedford, 2000).

Os dados do presente estudo revelam, ainda, que a suplementação enzimática pode ser limitada aos primeiros tempos de vida dos frangos, pois observou-se que surgem diferenças significativas no peso corporal, quando as aves ainda são muito jovens, aos 11 dias de idade, entre grupos suplementados e não suplementados. Os dados são consistentes com estudos anteriores, em que a resposta à suplementação β -glucanásica parece ocorrer

principalmente durante os primeiros dias de vida destas aves (Ferreira, 2009; Rotter *et al.*, 1989; Nahas & Lefrançois, 2001).

No presente ensaio, que durou 35 dias, os dados revelaram que os animais que receberam enzimas exógenas ao longo de toda a experiência (P35) alcançaram pesos corporais finais semelhantes aos que receberam enzimas até aos 23 dias de idade (P23) ou exclusivamente nos primeiros dias de vida (P11). Verificou-se assim, que a exposição à suplementação enzimática, em fases mais tardias do ciclo, não tem efeitos significativos, comparativamente à suplementação até aos 11 dias de idade. Estes dados corroboram com estudos realizados anteriormente por Hesselman e Aman (1986) e Nahas e Lefrançois (2001). Nahas e Lefrançois (2001) afirmaram ainda que é possível fornecer, sem prejuízo na performance zootécnica dos animais, dietas com altas incorporações de cevada e sem suplementação enzimática, nos últimos períodos de crescimento dos frangos. Isto está relacionado com a presença de um sistema digestivo mais desenvolvido e maduro, comparado com o sistema, em desenvolvimento, de frangos jovens, permitindo a utilização das dietas ricas em polissacáridos não amiláceos.

Em termos económicos, estes resultados, podem ser de grande relevância uma vez que uma suplementação com β -glucanases unicamente durante os primeiros estágios de crescimento das aves, em dietas à base de cevada, são suficientes para garantir um desempenho produtivo ótimo das aves. Isto indica que em dietas com porções significativas de PNAs solúveis, as enzimas têm um efeito direto na performance dos frangos, por suplementar a capacidade digestiva de aves quando estas ainda são jovens, como sugerido por Bedford (2000). Isto pode dever-se ao facto das aves mais jovens não possuírem uma capacidade digestiva completamente desenvolvida, para produzirem quantidades suficientes de enzimas digestivas endógenas, o que pode limitar a digestão e utilização nutricional dos alimentos e, consequentemente, poderá conduzir a piores performances por parte dos animais (Lindeman *et al.*, 1986; Nitsan *et al.*, 1991; Dunnington & Siegel, 1995) e, também, por possuírem uma flora microbiana menos numerosa (Kirjavainen & Gibson, 1999).

Por outro lado, a fibra dietética pode influenciar o tamanho e o desenvolvimento dos órgãos digestivos dos frangos. Dietas com altos níveis de PNA solúveis, como é o caso da cevada, induzem um considerável aumento de algumas porções do trato GI (Brenes *et al.*, 1993). No entanto, a adição de celulasas e hemicelulasas exógenas, levaram a uma diminuição da viscosidade do conteúdo digestivo, o que por si, conduz a um aumento da absorção de nutrientes e do trânsito digestivo, que pode conduzir a uma diminuição do peso relativo dos órgãos do trato digestivo e, um possível aumento no peso da carcaça. Neste estudo, porém, os pesos relativos do papo, moela e fígado e, os pesos e comprimentos relativos do duodeno, jejuno, íleo e cegos não variam significativamente entre os diferentes tratamentos.

Estes dados não estão de acordo com os resultados obtidos por vários autores, que referem haver modificações morfológicas, quando os animais são alimentados com dietas não suplementadas ricas em β -glucanos, mas está em concordância com os resultados de outros autores como é o caso de Saki (2005). Embora não se tenha observado diferença no tamanho dos órgãos, a viscosidade encontrada foi significativamente mais baixa ($p < 0,05$) no conteúdo digestivo de animais alimentados com dietas suplementadas durante todo o ensaio experimental (CP35), devido à exposição continuada ao complexo enzimático fornecido. A redução da viscosidade do conteúdo digestivo observado com a suplementação enzimática pode ter permitido um trânsito digestivo mais rápido, que poderá ter facilitado o contacto entre os nutrientes e as enzimas digestivas e, assim, aumentado a digestibilidade dos nutrientes (Langhout *et al.*, 1997; Lazaro *et al.*, 2003).

De referir, ainda, que neste estudo não foram encontradas diferenças significativas nas atividades enzimáticas gastrointestinais, entre tratamentos suplementados e não suplementados. Esta não distinção da atividade enzimática nos diversos compartimentos do trato gastrointestinal das aves, embora não esperada, pode-se dever à baixa sensibilidade do método usado. E a presença de atividade β -glucanásica no papo pode ser devida à presença de microrganismos celulósicos ou, então, devida à atividade endógena do próprio alimento.

Em conclusão, a cevada é um dos cereais mais problemáticos, para alimentação de frangos, devido aos PNA e altas viscosidades intestinais, com conseqüentemente efeito prejudicial na performance dos animais. Assim sendo, a suplementação enzimática pode ter conduzido a uma diminuição no tempo de retenção do bolo alimentar no intestino, com conseqüente melhoria no crescimento e desempenhos produtivos dos animais.

Capítulo V – Conclusão

Em geral, as enzimas alimentares contribuem para uma melhor performance dos animais, por diminuição da viscosidade do conteúdo digestivo de animais que consomem dietas à base de cereais. Contudo, alguns cereais, como é o caso da cevada e do trigo, podem conter atividade enzimática endógena, que podem originar diferentes respostas à suplementação enzimática.

Assim sendo, é importante realçar a importância que estes estudos têm para o sector avícola. Uma vez que este sector assume um grande peso na economia nacional e mundial e o preço das matérias-primas para estes animais (cereais) são cada vez mais desfavoráveis aos produtores avícolas, estes estudos podem contribuir para reduções importantes no custo de produção dos alimentos compostos.

O estudo realizado nesta dissertação indica que a suplementação enzimática para dietas à base de cevada é eficaz nos primeiros períodos do crescimento dos animais. A suplementação enzimática durante toda a vida produtiva dos frangos pode não ser necessária e pode ser substituída por uma suplementação que se restrinja aos primeiros 11 dias de vida das aves, em dietas à base de cevada. Além disso, uma exposição tardia a enzimas microbianas exógenas não parece afetar a eficácia da digestão alimentar em dietas à base de cevada para frangos. Estas observações podem ser de grande valor comercial para os fabricantes de alimentos composto e produtores de frangos uma vez que podem representar importantes reduções no custo de fabrico dos alimentos compostos.

Capítulo VI - Referências Bibliográficas

- Aastrup, S. (1979). The Effect of Rain on β -glucano Content in Barley Grains. *Carlsberg Research Communications*, 44,381-393.
- Antoniou, T. & Marquardt, R.R. (1981). Influence of rye pentosans on the growth of chicks. *Poultry Science*, 60,1898-1904.
- Apajalahti, J. & Bedford, M.R. (1999). Improve bird performance by feeding its microflora. *World's Poultry Science Journal*, 15, 20–23.
- Attala, R.H. (1993). In *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases. *Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation*. Suominen, P. & Reinikainen.
- Barnes, R.F., Miller, D.A., & Nelson C.J. (1995). Hay and silage management. *In Forages: An introduction to grassland agriculture*. Iowa State Univ. Press.
- Barteczko, J., Augustyn, R., Lasek, O. & Smulikowska, S. (2009). Chemical composition and nutritional value of different wheat cultivars for broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18, 124–131.
- Bedford, M.R. & Classen, H.L. (1992). Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved rates and food conversion efficiency of broiler chicks. *Journal of Nutrition*, 122, 560–569.
- Bedford, M.R. (1993). Mode of action of feed enzymes. *Journal of Applied Poultry Research*, 2, 85-92.
- Bedford, M.R. (1995). Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology*, 53, 145-155.
- Bedford, M.R. (1996). Interaction between ingested feed and the digestive system in poultry. *The Journal of Applied Poultry Research*, 5, 86-95.
- Bedford, M.R. & Morgan, A.J. (1996). The use of enzymes in poultry diets. *World's Poultry Science Journal*, 52, 61–68.
- Bedford, M.R. (2000). Exogenous enzymes in monogastric nutrition – their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*, 86, 1-13.

- Béguin, P. & Aubert, J.P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 25-58.
- Bonawitz, N.D. & Chapple C. (2010). The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetics*, 44, 337-63.
- Brenes, A.M.S., Guener, W., & Marquardt, R.R. (1993). Effect of enzyme supplementation on the performance and digestive tract sue of broiler chickens fed wheat- and barley-based diets. *Poultry Science*, 72, 1731-1739.
- Brett, C.T. & Waldron, K.W. (1996). *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Wall*. 2nd ed. *Chapman & Hall*, London, 255p.
- Carpita, N.C. & Gibeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3, 1-30.
- Carré, B., Derouet, L., & Leclercq, B. (1990). The digestibility of the cell-wall polysaccharides from wheat (bran and whole grain), soybean meal, and white lupin meal in cockerels, muscovy ducks, and rats. *Poultry Science*, 69, 623-633.
- Carré B., Mignon-Grasteau S., Péron A., Juin H. & Bastianelli D. (2007). Wheat value: improvements by feed technology, plant breeding and animal genetics. *World's Poultry Science Journal*, 63, 585-596
- Castellini, C., Dal Bosco, A., Mugnai, C., & Bernardini, M. (2002). Performance and behaviour of chickens with different growing rates reared according to the organic system. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 561-573.
- Cheeke, P.R. (1991). *Applied Animal Nutrition – Feed and Feeding*. *Macmillan Publishing Company*. United States. ISBN 0-02-322115-1.
- Chesson, A. (1991). Effects of Supplementary Enzymes in Barley Diets, Options Méditerranéennes. *Série Séminaires*, 20, 55-62.
- Choct, M. & Annison, G. (1990). Antinutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. *British Poultry Science*, 31, 811-821.
- Choct, M., Hughes, R. J., Wang, J., Bedford, M. R., Morgan, A. J., & Annison, G. (1996). Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *British Poultry Science*, 37, 609-621.
- Choct, M. (1997). Feed Non-Starch Polysaccharides: Chemical Structures and Nutritional Significance. *Feed Milling International*, 13-26.

- Choct, M. (2001). Enzyme supplementation of poultry diets based on viscous cereals. In: Bedford, M.R. & Partridge, G.G. (Eds.). *Enzymes in farm animal nutrition*. Wallingford, Oxfordshire: CAB International.
- Choct, M. (2006). Enzymes for the Feed Industry: Past, Present and Future. *World's Poultry Science Journal*, Vol. 62, March.
- Classen, H.L., Campbell, G.L., Rossnagel, B.G., Bhatti, R., & Reichert, R.D. (1985). Studies on the use of hulless barley in chick diets: deleterious effects and methods of alleviation. *Canadian Journal of Animal Science*, 65, 725-733.
- Cosgrove, D.J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 391-417.
- Cosgrove, D.J. (2001) Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiology*, 125, 131-134.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 850-861.
- Coughlan, M.P. & Hazlewood, G.P. (1993). β -1,4-D-xylan degrading enzymes systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 17, 259-289.
- Dibner, J. J. & Richards, J. D. (2004). The digestive system: Challenges and opportunities. *Journal of Applied Poultry Research*, 13, 86-93.
- Dunnington, E.A. & Siegel, P.B. (1995). Enzyme activity and organ development in newly hatched chicks selected for high or low eight week body weight. *Poultry Science*, 74, 761-770.
- Edwards, C.A., Johnson, I.T., & Read, W.W. (1988). Do viscous polysaccharides slow absorption by inhibiting diffusion or convection? *European Journal of Clinical Nutrition*, 42, 306-309.
- Englert, S. (1982). *Avicultura*. 4ª Edição. L.e.a.l. Porto Alegre. Brasil.
- Evans, C. S., & Hedger, J. N. (2001). Degradation of plant cell wall polymers. In G. M. Gadd (Ed.), *Fungi in Bioremediation*. Cambridge University: Cambridge University Press.

- Fanatico, A.C., Pillai, P.B., Cavitt, L.C., Owens, C.M., & Emmert J.L. (2005). Evaluation of slower-growing broiler genotypes grown with and without outdoor access: growth performance and carcass yield. *Poultry Science*, 84, 1321-1327.
- Fanatico, A.C. (2006). Alternative poultry production systems and outdoor access. Disponível em: <http://www.attra.org/attrapub/PDF/poultryoverviews.pdf>.
- FAO (2010). *Poultry Meat & Eggs - agribusiness handbook*. Itália.
- FAO (2012). *FAO Statistical Yearbook 2012 – World Food and Agriculture*. Rome
- Ferket, P.R., & Gernat, A.G. (2006). Factors That Affect Feed Intake of Meat Birds: A Review. *International Journal of Poultry Science*, 5, 905-911.
- Ferreira, A.P.A. (2009). *Efeito da suplementação enzimática em fases específicas do crescimento dos frangos ao nível da performance produtiva e dimensões do sistema gastrointestinal*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia/Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Ferreira, L.M.A. & Fernandes, T.H. (1992). Melhoramento da biodegradação da celulose. *Veterinária Técnica*, 6, 14-19.
- Ferreira, L.M.A. & Fernandes, T.H. (1993). Mecanismos moleculares de degradação da cellulose e hemicelluloses. *Revista Portuguesa Ciências Veterinárias*, 505, 12-54.
- Field, T.G. (2004). *Scientific farm animal production: an introduction to animal science* (8th edition). Pearson Education. New Jersey.
- Figueiredo, A.A., Correia, B.A., Ribeiro, T., Ponte, P.I.P., Falcão, L., Freire, Prates, J.A.M., Ferreira, L.M.A., Fontes, C.M. & Lordelo, M.M. (2012). The effects of restricting enzyme supplementation in wheat-based diets to broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 172, 194-200.
- Fontes, C.M.G.A., Gilbert, H.J., Hazelwood, G.P., Clarke, J.H., Prates, J.A.M., McKie, V.A., et al. (2000). A novel *Cellvibrio mixtus* family 10 xylanase that is both intracellular and expressed under non-inducing conditions. *Microbiology*, 146, 1959-1967.
- Fontes, C.M.G.A., Ponte, P.I.P., Reis, T.C., Soares, M.C., Gama, L.T., Dias, F.M. & Ferreira, L.M.A. (2004). A family 6 carbohydrate-binding module potentiates the efficiency of a recombinant xylanase used to supplement cereal-based diets for poultry. *British Poultry Science*, 45, 648-656.

- Fontes, C.M.G.A., & Gilbert, H. J. (2010). Cellulosomes: Highly Efficient Nanomachines Designed to Deconstruct Plant Cell Wall Complex Carbohydrates. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 655-681.
- Fry, S.C. (1989) Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. *Plant Physiology*, 75, 532-536.
- Garcia, M.R, Lázaro, M.A., Latorre, M.I., Gracia, G.G. & Mateos (2008). Influence of enzyme supplementation and heat processing of barley on digestive traits and productive performance of broilers. *Poultry Science*, 87, 940-948.
- Gibeaut, D.M. & Carpita, N.C. (1994). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB Journal*, 8, 904-915.
- Gilbert, H.J. & Hazlewood, G.P. (1993). Bacterial cellulases and xilanases. *Journal General Microbiology*, 139, 187-194.
- Gordon, S.H., & Charles, D.R. (2002). Niche and organic chicken products. Nottingham: Nottingham University Press.
- Grunert, K. G. (2005). Food quality and safety: consumer perception and demand. *European Review of Agricultural Economics*, 32, 369-391.
- Ha, M.A., Apperley, D.C., & Jarvis, M.C. (1997). Molecular rigidity in dry and hydrated onion cell walls. *Plant Physiology*, 115, 593-598.
- Hayashi. (1989). Xyloglucans in the Primary-Cell Wall. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 40, 139-168.
- Heredia, A., Jimenes, A., & Guillen, R. (1995). Composition of plant cell walls. *Z Lebensm Unters Forsch*, 200, 24-31.
- Hesselman K., & Åman, P. (1986). The effect of β -glucanase on the utilisation of starch and nitrogen by broiler chickens fed on barley of low and high viscosity. *Animal Feed Science and Technology*, 15, 83-93.
- Hogg, D.; Pell, G.; Dupree, P.; Goubet, F.; Martin-Orue, S.M; Armand, S. & Gilbert, H.J. (2003). The modular architecture of Cellvibrio japonicus mannanases in glycoside hydrolase families 5 and 26 points to differences in their role in mannan degradation. *Biochemical Journal*, 371, 1027-43.

- IACA (2012). Anuário 2012. *Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais*. Enigma Editores. Lisboa.
- Ikegami, S., Tsuchihashi, F., Harada, H., Tsuchihashi, N., Nishide, E., & Innami, S. (1990). Effects of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestive organs in rats. *Journal of Nutrition*, 120, 353.
- INE (2012). Anuário Estatístico de Portugal 2011. *Instituto Nacional de Estatística, IP*. Lisboa.
- INE (2012b). Estatísticas Agrícolas 2011. *Instituto Nacional de Estatística*. Estatísticas Oficiais. ISSN 0079-4139
- Jarvis, M.C. (1984). Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell and Environment*, 7, 153-164.
- Jeroch, H. & Dänicke, S. (1996). Barley in Poultry Feeding: A Review. *World's Poultry Science Journal*, 51, 271-291.
- Keegstra, K., Talmadge, K.W., Bauer, W.D., & Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology*, 51, 188-196.
- Kirjavainen, P.V. & Gibson, G.R. (1999). Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *Annals of Medicine*, 31, 288-292.
- Knudsen, E.B. (1997). Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal Feed Science and Technology*, 67, 319-338.
- Leeson, S. & Summers, J. D. (2001). *SDcott's Nutrition of the Chicken*. 4ª edição. University Books. Canada.
- Lindeman, M.D., Cornelius, S.G., Elkandelgy, S.M., Moser, R.L., & Pettigrew, J.E. (1986). Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *Journal of Animal Science*, 62, 1298-1307.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H. & Pretorius, I.S. (2002). Microbial Cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 506-577.

- Marquardt, R.R. (1997). Enzyme enhancement of the nutritional value of cereals: role of viscous, water-soluble, non starch polysaccharides in chick performance. In: Marquardt, R.R. & Han, Z. *Enzymes in Poultry and Swine Nutrition*.
- McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J. & Morgan, C. (1995). *Animal Nutrition* (5^a ed.). Inglaterra: Longman Scientific & Technical.
- MDRP (2007). Carne – Diagnóstico Sectorial. *Gabinete de Planeamento e Políticas*. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Minic, Z. & Jouanin, L. (2006). Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 435-449.
- Nahas, J., & Lefrançois, M.R. (2001). Effects of feeding locally grown whole barley with or without enzyme addition and whole heat on broiler performance and carcass traits. *Poultry Science*, 80, 195-202.
- Nitsan, Z., Benavraham, G., Zoref, Z. & Nir, I. (1991). Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. *British Poultry Science*, 32, 515-523.
- North, M.O. & Bell, D.D. (1990). Commercial Chicken Production Manual. Fourth Edition. AviBook Published by Van Nostrand Reinhold. ISBN 0-442-31882-2.
- Olukosi, O.A., Cowieson, A.J., & Adeola, O. (2007). Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase and protease or phytase individually or in combination in broilers. *Poultry Science*, 86, 77-86.
- Palander, S., Näsi, M. & Järvinen, S. (2005). Effect of age of growing turkeys on digesta viscosity and nutrient digestibility of maize, wheat, barley and oats fed as such or with enzyme supplementation. *Archives of Animal Nutrition*, 59, 191-203.
- Pedersen, S., & Thomsen, M.G. (2000). Heat and moisture production of broilers kept on straw bedding. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 75, 177-187.
- Perttilä, S., Valaja, J., Partanen, K., Jalava, T., Kiiskinen, T., & Palander, S. (2001). Effects of preservation method and β -glucanase supplementation on ileal amino acid digestibility and feeding value of barley for poultry. *British Poultry Science*, 42, 218-229.
- Petersen, S. T., Wiseman, J., & Bedford, M. R. (1999). The effect of age and diet on the viscosity of intestinal contents in broiler chicks. *British Poultry Science*, 40, 364-70.

- Pettersson, D., & Åman, P. (1989). Enzyme supplementation of a poultry diet containing rye and wheat. *British Journal of Nutrition*, 62, 139-149.
- Philip, J.S., Gilbert, H.J., & Smithart, R.R. (1995). Growth, viscosity and beta-glucanase activity of intestinal fluid in broiler chickens fed on barley-based diets with or without exogenous beta-glucanase. *British Poultry Science*, 36, 599-603.
- Pirgozliev, V.R., Birch, C.L., Rose, S.P., Kettlewell, P.S. & Bedford, M.R. (2003). Chemical composition and the nutritive quality of different wheat cultivars for broiler chickens. *British Poultry Science*, 44, 464-475
- Prade, R.A. (1999). Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 16, 361-91.
- Quershi, M.A., Hussain, I., & Heggen, C.L. (1998). Understanding immunology in disease development and control. *Poultry Science*, 8, 1126-1129.
- Rauwn, W.M., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E.N., & Grommers, F.J. (1998). Undesirable side effect of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science*, 56, 15-33.
- Ravindran, V. (2010). *Poultry feed availability and nutrition in developing countries*. Acedido em Mar.8, 2013, disponível em: <http://www.fao.org/docrep/013/al708e/al708e00.pdf>.
- Ribeiro, T., Lordelo, M., Ponte, P., Maças, B., Prates, J., Aguiar, F. M., Ferreira, L.M. & Fontes, C. (2011a). Levels of endogenous β -glucanase activity in barley affect the efficacy of exogenous enzymes used to supplement barley-based diets for poultry. *Poultry Science*, 90, 1245-1256.
- Ribeiro, T., Lordelo, M. M., Prates, J. A., Falcão, L., Freire, J. P., Ferreira, L. M. & Fontes, C. (2011b). The thermostable beta-1,3-1,4-glucanase from *Clostridium thermocellum* improves the nutritive value of an highly viscous barley-based diets for broilers. *British Poultry Science*, 53, 224-234.
- Richards, M.P., & Proszkowiec-Weglarz, M. (2007). Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. *Poultry Science*, 86, 1478-1490.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A. & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis and oligalacturonide-related signal. *Phytochemistry*, 57, 929-967.
- ROSS. (2009). Ross Broiler Management Manual. Escócia: Aviagen.

- ROSS. (2012). *ROSS Nutrition Supplement 2009*. Escócia: Aviagen.
- Rotter, B.A., Nesar, M., Guenter, W., & Marquardt, R.R. (1989). Effect of enzymes supplementation on the nutritive value of hullless barley in chicken diets. *Animal Feed Science and Technology*, 24, 233-245.
- Saki, A.A. (2005). Effect of Wheat and Barley Viscosity on Broiler Performance in Hamadan Province. *International Journal of Poultry Science*, 4, 7-10.
- Salih, M.E., Classen, H.L., & Campbell, G.L. (1991). Response of chickens fed hullless barley to dietary b-glucanase at diferents ages. *Animal Feed Science and Technology*, 33, 139-149.
- Serrano, L.C. (2012). *Contribuição para o estudo da actividade in vivo de mini-celulosomas do Clostridium thermocellum em dietas à base de cevada para frangos de carne*. Dissertação para a Obtenção de Grau de Mestre. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Silva, S.S.P. & Smithard, R.R. (2002). Effect of enzyme supplementation of a rye-based diet on xylanase activity in the small intestine of broilers, on intestinal crypt cell proliferation and on nutrient digestibility and growth performance of the birds. *British Poultry Science*, 43, 274-282.
- Singh, S., Madlala, A.M. & Prior, B.A. (2003). Thermomyces lanuginosus: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 3-16.
- Slominski, B. (2011). Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science*, 90, 2013-2023.
- Smits, C.H.M. & Annison, G. (1996). Non-starch plant polysaccharide in broiler nutrition – towards a physiologically valid approach to their determination. *World Poultry Science Journal*, 52, 832-838.
- Sørensen, P., Su, G., & Kestin, S.C. (2000). Effect of age and stoking density on leg weakness in broiler chickens. *Poultry Science*. 79, 864-870.
- Steenfeldt, S., Mullerts & Jensen, J.F. (1998). Enzyme supplementation of wheat-based diets for broilers. 1. Effect on growth performance and intestinal viscosity. *Animal Feed Science and Technology*, 75, 27-43.
- Steenfeldt, S. (2001). The dietary effect of different wheat cultivars for broiler chickens. *British Poultry Science*, 42, 595-609.

- Svihus, B., Selmer-Olsen, I., & Båthen, E. (1995). Effect of different preservation methods for high moisture barley on feeding value for broiler chickens. *Acta agriculturae Slovenica*, 45, 252-259.
- Talbott, L.D., & Ray, P.M. (1992). Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides. *Plant Physiology*, 98, 357-368.
- Thompson, J.A. (1993). Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 104, 65-82.
- Tomme, P., Warren, R.A.J. & Gilkes, N.R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances Microbiology Physiology*, 37, 1-81.
- Uhlir, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications* (1 ed.). (E. M. Linsmaler-Bednar, Trad.) Estados Unidos da América: John Wiley & Sons, Inc. Campos, L. S., 2005.
- Vahouny, G.V., Tombes, R., Cassidy, M.M., Krichevsky, D., & Gallo, L.L. (1981). Dietary fibres: V. Binding of bile salts, phospholipids and cholesterol from mixed micelles by bile acid sequestrants and dietary fibres. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 166.
- Vahouny, G.V. (1982). Dietary fiber, lipid metabolism and atherosclerosis. *Fed Proc*, 41, 2801-2806.
- Van der Klis, J.D., Van Voorst, A. & Van Cruyningen, C. (1993). Effect of a soluble polysaccharide (carboxymethyl cellulose) on the physico-chemical conditions in the gastrointestinal tract of broilers. *British Poultry Science*, 34: 971-983.
- Villamide, M. J., Fuente, J. M., Perez de Ayala, P., & Flores, A. (1997). Energy Evaluation of Eight Barley Cultivars for Poultry: Effect of Dietary Enzyme Addition. *Poultry Science*, 76, 834-840.
- Viveros, A., Brenes, A., Pizarro, M., & Castaño, M. (1994). Effects of enzyme supplementation of a diet based on barley, and autoclave treatment, on apparent digestibility, growth performance and gut morphology of broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 48, 237-251.
- Vranjes, M.V., & Wenk, C. (1995). The influence of extruded vs. untreated barley in the feed, with and without dietary enzyme supplement on broiler performance. *Animal Feed Science and Technology*, 54, 21-32.
- Vries, R.P. & Visser, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 497-522.

- Wagner, D.D., & Thomas, O.P. (1978). Influence of diets containing rye or pectin on the intestinal flora in chicks. *Poultry Science*, 57, 971-975.
- Waldron, K.W., Parker, M.L. & Smith, A.C. (2003). Plant cell walls and food quality. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 101-119.
- Warren, R.A.J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, 50, 183-212.
- Weeks, C.A., Nicols, C.J., Sherwin, C.M., & Kestin, S.C. (1994). Comparison of the behavior of broiler chickens in indoor and free-ranging environments. *Animal Welfare*, 3, 179-192.
- Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W. & Knox, J.P. (2001). Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47, 9-27.
- Williams, P. E. V., Geraert, P. A., Uzu, G., & Annison, G. (1997). Factors affecting non-starch polysaccharide digestibility in poultry. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 26, 125-134.
- Yasar, S. & Forbes, J.M. (1999). Performance and Gastrointestinal Response of Broiler Chickens Fed on Cereal Grain-Based Foods Soaked in Water. *British Poultry Science*, 40, 65-76.
- Yu, B., Hsu, J.C, & Chiou, P.W.S. (1998). Effects of β -glucanase supplementation of barley diets on growth performance of broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 70, 353-361.
- Yunis, R., Ben-David, A., Heller, E.D., & Cahaner, A. (2000). Immunocompetence and viability under commercial conditions of broiler groups differing in growth rate and antibody response to *Escherichia coli* vaccine. *Poultry Science*, 79, 810-816.

Anexo 1 - Necessidades Nutricionais de Frangos de Carne

Tabela 11 – Necessidade Nutricionais em Percentagem ou por kg de dieta (numa dieta com 90% de Matéria Seca)

Nutrientes	Unidades	Starter	Grower	Finisher
		0-3 semanas	3-6 semanas	6-8 semanas
Energia Metabolizável	kcal/kg	3200	3200	3200
Proteína Bruta	%	23,00	20,00	18,00
Aminoácidos				
Arginina	%	1,25	1,10	1,00
Glicina + Serina	%	1,25	1,14	0,97
Histidina	%	0,35	0,32	0,27
Isoleucina	%	0,80	0,73	0,62
Leucina	%	1,20	1,09	0,93
Lisina	%	1,10	1,00	0,85
Metionina	%	0,50	0,38	0,32
Metionina + Cistina	%	0,90	0,72	0,60
Fenilalanina	%	0,72	0,65	0,56
Fenilalanina + Tirosina	%	1,34	1,22	1,04
Prolina	%	0,60	0,55	0,46
Treonina	%	0,80	0,74	0,68
Triptofano	%	0,20	0,18	0,16
Valina	%	0,90	0,82	0,70
Gordura Bruta				
Ácido Linoleico	%	1,00	1,00	1,00
Macrominerais				
Cálcio	%	1,00	0,90	0,80
Cloreto	%	0,20	0,15	0,12
Magnésio	mg	600	600	600
Fósforo disponível	%	0,45	0,35	0,30
Potássio	%	0,30	0,30	0,30
Sódio	%	0,20	0,15	0,12

Adaptado de NRC (1994)

Tabela 12 - Necessidade Vitamínicas (numa dieta com 90% de Matéria Seca)

Nutrientes	Unidades	Starter	Grower	Finisher
		0-3 semanas	3-6 semanas	6-8 semanas
Vitaminas				
A	IU	1500	1500	1500
D ₃	ICU	200	200	200
E	IU	10	10	10
K	mg	0,50	0,50	0,50
B ₁₂	mg	0,01	0,01	0,007
Biotina	mg	0,15	0,15	0,12
Colina	mg	1300	1000	750
Niacina	mg	35	30	25
Acido Pantoténico	mg	10	10	10
Riboflavina	mg	3,6	3,6	3,0
Tiamina	mg	1,80	1,80	1,80

Adaptado de NRC (1994)

Anexo 2 - Reagentes e Soluções

Tampão PC

Para 50mM de Tampão PC, pH 6,5:

- 8,7g/L K_2HPO_4
- 2,52 g/L Ácido cítrico

Placas de Agar com Substrato

- 2% agar
- 0,1% β -glucano
- 10 mM Tris pH8

Solução Corante de Vermelho do Congo

- 1% Congo Red em 10mM Tris pH8

Solução Descorante

- 1M NaCl em 10 mM Tris pH8

Solução precipitante A

Para 60 ml utilizar:

- 2,4 g acetato de sódio
- 0,24 g acetato de zinco
- 9 ml água
- Acertar pH a 5
- Perfazer volume com água para 12ml
- Adicionar 48 ml de metoxietanol